

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭60-58077

⑬ Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 昭和60年(1985)4月4日
C 12 N 15/00		7115-4B	
C 07 H 21/04		7252-4C	
C 07 K 13/00		6464-4H	
C 12 N 1/16		6712-4B	
C 12 P 21/02		7235-4B	※審査請求 未請求 発明の数 21 (全38頁)

⑯ 発明の名称 GAL1 酵母菌プロモーターの使用

⑰ 特 願 昭59-35472

⑱ 出 願 昭59(1984)2月28日

優先権主張 ⑲1983年2月28日⑳米国(US)㉑470911

⑳ 発 明 者	デヴィッド・ボットス ティン	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02146、ブルックリン、パーク・ストリート 80
㉑ 発 明 者	ロナルド・ウエイン・ デイヴィス	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025、メンロ・パーク、コンコード・ドライブ 418
㉒ 出 願 人	コラボラティブ・リサーチ・インコーポレイテッド	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02173、レキシントン、スプリング・ストリート 128

㉓ 代 理 人 弁理士 佐々木 清隆 外3名
最終頁に続く

明細書の序言(内容に変更なし)
明 細 書

1 発明の名称

GAL1 酵母菌プロモーターの使用

2. 特許請求の範囲

1) 酵母菌体中の遺伝子の出現を指示するガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子に連結した

GAL1 プロモーターを含有することを特徴とする DNA 分節。

2) 前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

3) 前記遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

4) 前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

5) 前記遺伝子がブレブレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

6) 前記 GAL1 プロモーターが 755塩基対 DNA 配列であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

7) 前記 GAL1 プロモーターが 820塩基対 DNA 配列であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の DNA 分節。

8) 所望のタンパク質を出現させるために使用する DNA 分節に連結した GAL1 プロモーター。

9) GAL1 プロモーターを DNA 分節中に導入し、この分節が染色体あるいは媒介体中の遺伝子に該染色体あるいは媒介体が複製され細胞によってその遺伝子情報の一部として運ばれその遺伝子が発現されるような方法で連結されることから成ることを特徴とする酵母菌中にポリペプチドを出現させる方法。

10) 前記遺伝子が酵母菌ゲノムにとつて異質であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

11) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンで前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であること

を特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

12) 特許請求の範囲第11項の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

13) 前記ポリペプチドがインターフェロンであり、前記遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

14) 特許請求の範囲第13項の方法により製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

15) 前記ポリペプチドがプロレンニンであり前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

16) 特許請求の範囲第15項に記載の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

17) 前記ポリペプチドがプレプロレンニンで前記遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

18) 特許請求の範囲第17項に記載の方法で製造されることを特徴とするポリペプチド生成物。

19) 前記酵母がサツカロミセス・セレビジェ

24) 前記ポリペプチドがプレプロレンニンで、前記遺伝子がプレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

25) 受入れ番号20643、菌株名称CGY196でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに預けられている酵母菌株。

26) 受入れ番号202661、菌株名称CGY457、でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに預けられた酵母菌株。

27) 受入番号20662、菌株名称CGY461でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに預けられた酵母菌株。

28) 受入れ番号20663、菌株名称CGY528でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに預けられた酵母菌株。

29) 合成DNA配列

P_{GAL1} -A₆CCCGGATCTCGACC-ATG-X
(Xはガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子。)

30) 合成DNA配列

株であることを特徴とする特許請求の範囲第9項に記載の方法。

20) DNA分節が酵母菌体に入れられ、この酵母菌体をグルコースを含有する培地で培養するが、この場合に前記酵母菌体は前記グルコースを代謝作用で変化させ、次に前記菌体が前記ポリペプチドを培地にガラクトースが存在するときに出現させることを特徴とする酵母菌ゲノムに異質の遺伝子に連結したDNA分節中のGAL1プロモーターを使用して酵母菌中にポリペプチドを得る方法。

21) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンで、前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

22) 前記ポリペプチドがインターフェロンで、前記遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

23) 前記ポリペプチドがプロレンニンで、前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第20項に記載の方法。

P_{GAL1} -TTATTCCTCTACCGGATCAA-ATG-X
(Xはガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子。)

31) DNA組換え配列

P_{GAL1} -A₆CCCGGATCTCGACC-ATG-X
(P_{GAL1} はガラクトキナーゼのGAL1プロモーターの820塩基対DNA配列であり、Xは酵母菌に出現されるポリペプチドのDNA配列である。)

32) 前記ポリペプチドがウシ成長ホルモンであることを特徴とする特許請求の範囲第31項に記載のDNA組換え配列。

33) 前記ポリペプチドがインターフェロンであることを特徴とする特許請求の範囲第31項に記載のDNA組換え配列。

34) 前記ポリペプチドがプロレンニンであることを特徴とする特許請求の範囲第31項に記載のDNA組換え配列。

35) DNA組換え配列

P_{GAL1} -TTATTCCTCTACCGGATCAA-ATG-X
(P_{GAL1} はガラクトキナーゼのGAL1プロモーターの755塩基対DNA配列であり、Xは酵母菌に

出現されるポリペプチドのDNA配列である)。

36) 前記ポリペプチドがブレブレンニンである特許請求の範囲第35項に記載のDNA組換え配列。

37) 異質の遺伝子に連結されたガラクトキナーゼ遺伝子の調節された主なメッセンジャーRNAの写しのためのプロモーターを運ぶ酵母菌ゲノムから勝動されたGAL1プロモーターから成るDNA分節。

38) 前記異質の遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

39) 前記異質の遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

40) 前記異質の遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

41) 前記異質の遺伝子がブレブレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第37

項に記載のDNA分節。

42) 前記GAL1プロモーターが0.82キロボースDNA配列を有することを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

43) 前記GAL1プロモーターが0.755キロボースDNA配列を有することを特徴とする特許請求の範囲第37項に記載のDNA分節。

44) PvuIIの位置に酵母菌の写し開始位置を有する酵母菌2μプラスミドの断片、およびEcoRIの位置にGAL1プロモーターを有する酵母菌染色体DNAからの断片から成る変形個所を有するプラスミドYIp5から成るプラスミド。

45) 前記GAL1プロモーターに連結したウシ成長ホルモン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

46) 前記GAL1プロモーターに連結したインターフェロン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

47) 前記GAL1プロモーターに連結したプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請

求の範囲第44項に記載のプラスミド。

48) 前記GAL1プロモーターに連結したブレブレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第44項に記載のプラスミド。

49) EcoRIの位置にGAL1プロモーターを有する酵母菌染色体DNAからの断片からなる変形個所を有するプラスミドYIp5から成ることを特徴とするプラスミド。

50) 酵母菌中の選択用遺伝子がUra3遺伝子から成るDNA分節であることを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

51) 前記GAL1プロモーターに連結したウシ成長ホルモン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

52) 前記GAL1プロモーターに連結したインターフェロン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

53) 前記GAL1プロモーターに連結したプロレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

54) 前記GAL1プロモーターに連結したブレブレンニン遺伝子を有することを特徴とする特許請求の範囲第49項に記載のプラスミド。

55) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20643、菌株名称CGY196の酵母菌中に見出されたDNA組換え物質。

56) 前記物質がウシ成長ホルモン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第55項に記載のDNA組換え物質。

57) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20661、菌株名称CGY457の酵母菌株中に見出されたDNA組換え物質。

58) 前記物質がインターフェロン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第57項に記載のDNA組換え物質。

59) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20662、菌株名称CGY461の酵母菌株中に見出されたDNA組換え物質。

60) 前記物質がプロレンニン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第59項に記載のDNA組換え物質。

61) アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション受入れ番号20663、菌株名称GGY528の酵母菌中に見出されたDNA組換え物質。

62) 前記物質がブレプロレンニン遺伝子に連結したGAL1プロモーターから成ることを特徴とする特許請求の範囲第61項に記載のDNA組換え物質。

63) 酵母菌およびバクテリアに挿入可能であることを特徴とする酵母菌ゲノムへ異質の遺伝子に連結したGAL1プロモーターを運ぶ媒介体。

64) 前記遺伝子がウシ成長ホルモン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

65) 前記遺伝子がインターフェロン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

66) 前記遺伝子がプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

67) 前記遺伝子がブレプロレンニン遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第63項に記載の媒介体。

68) 下記のウシ成長ホルモン・ヌクレオチド配列から成ることを特徴とするDNA組換え物質：

```

-26                               -20
      GAATTCCCGGCTCTCTGTGACACCTCACCACCT ATG ATG OCT GCA GGC GCG CGG ACC TCC CTG CTC CTG OCT TTC GGC CTG
-110 HaeRI                               PstI
-10                               10                               20
leu cys leu pro trp thr gln val val gly ala phe pro ala met ser leu ser gly leu phe ala asn ala val leu arg ala gln his
CTC TGC CTG GCG TGG ACT CAG GTG GTG GGC GGC TTC CCA GCG ATG TCC TTG TCC GGC CTG TTT GCG AAC GCT GTG CTC CGG GCT CAG CAC
-30                               HaeIII(HmaI)                               60
leu his gln leu ala ala asp thr phe lys glu phe glu arg thr tyr ile pro glu gly gln arg tyr ser ile gln asn thr gln val
CTG CAT CAG CTG OCT GCT GAC ACC TTC AAA GAG TTT GAG CCG ACC TAC ATC CCG GAG GGA CAG AGA TACTTCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT
-50                               PvuII                               (HhaI)                               150
ala phe cys phe ser glu thr ile pro ala pro thr gly lys asn glu ala gln gln lys ser asp leu glu leu leu arg ile ser leu
GCG TTC TGC TTC TCT GAA ACC ATC CCG GCG GCG ACC GGC AAG AAT GAG GCG CAG CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT GCG ATC TCA CTG
-70                               80                               240
leu leu ile gln ser trp leu gly rro leu gln phe leu ser arg val phe thr asn ser leu val phe gly thr ser asp arg val tyr
CTC CTC ATC CAG TCG TGG CTT GGG GCG CTG CAG TTC CTC AGC AGA GTC TTC ACC AAC AGC TTG GTG TTT GCG ACC TCG GAC CGT GTC TAT
-90                               ApsI                               PstI                               330
glu lys leu lys asp leu glu glu gly ile leu ala leu met arg glu val glu asp gly thr pro arg ala gly gln ile leu lys gln
GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAA GCG ATC CTG GCG CTG ATG CCG GAG GTG GAA GAT GCG ACC GCG GCG GCT GGG CAG ATC CTC AAG CAG
-120                               SmaI                               420
thr tyr asp lys phe asp thr asn met arg ser asp asp ala leu leu lys asn tyr gly leu leu ser cys phe arg lys asp leu his
ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATG GCG AGT GAC GAC GCG CTG CTC AAG AAC TAC GGT CTG CTC TCC TGC TTC CCG AAG GAC CTG CAT
-150                               160                               170                               510
lys thr glu thr tyr leu arg val met lys cys arg arg phe gly glu ala ser cys ala phe END
AAG ACG GAG ACG TAC CTG AAG GTC ATG AAG TGC CUC GCG TTC GGG GAG GCG ACC GCG TTT GCG TTC TAG TTGCCAGCCATCTGTTGTTTTCGCGCTCCCGC
-180                               190                               607
      PvuII

```

GTGCTTCCTTGACCGCTGGAAGTGGCACTGCCACTGCTCTTCTCTAATAAAATGAGGAATTCATCC(A)_n

677

69) 特許請求の範囲第68項に記載のヌクレ
オチド配列の酵母菌中に出現して生成されること
を特徴とするポリペプチド生成物。

70) 前記 GAL1 プロモーターが下記のヌクレ
オチド配列を有することを特徴とする特許請求の
範囲第1項に記載のDNA分節：

```

10      20      30      40      50      60      70
GAATTGACAGGTTATCAGCAACACAGTCATATCCATTCTCAATTAGCTCTACCACAGTGTGTGAACCAA
80      90      100     110     120     130     140
TGTATCCAGCACCACCTGTAAACCAAAACAATTTTGAAGTACTTTCACCTTTGTAACTGAGCTGTCAATTTA
150     160     170     180     190     200     210
TATTGAATTTTCAAAAATCTTACTTTTTTTTTTGGATGGAACGCAAAAGAAATTTAATAATCATATTACATG
220     230     240     250     260     270     280
GCATTACCAACCATATACATATCCATATACATATCCATATCTAATCTACTATATTTGTGTATGTAAAGA
290     300     310     320     330     340     350
GCCCCATTATCTTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGAAACTTTCACTAATAAGGCTTAACGTCTCATTTGCT
360     370     380     390     400     410     420
ATATTGAAGTACGGATTAGAAACCCGAGCGGGTACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGT
430     440     450     460     470     480     490
CCTCCTCTTACCCGCTCCGCTTCTGAAACGCGATGTGCTTCCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGA
500     510     520     530     540     550     560
TTCTACAATACTAGCTTTTATGTTATGAAAGGAAAAATTTGCCAGTAACCTGGCCCCCAAAACCTTCAA
570     580     590     600     610     620     630
ATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATCCGATTAGTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGTAAT
640     650     660     670     680     690     700
TAATCAGCGAAGCGATGATTTTGTATCTATTAAAGATATATAAATGCAAAAACCTGCATAACCACTTTAA
710     720     730     740
CTAATACTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTTACTTCTTATTC
AAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATT
750     760     770

GTTAATATACCTCTATACITTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGATCC
780     790     800     810     820

```

3. 発明の詳細な説明

DNA組換え工業技術の発展により種々な遺伝子の自然な遺伝情報指定配列を有するバクテリアの無性生殖が可能になった。[スイバード P.H., シャイン J., マーシャル J.A., バクスター J.D., およびグッドマン H.M., 「ネイチャー 270」, 486-494, (1977), および, シャイン J., スイバード P.H., マーシャル J.A., バクスター J.D. およびグッドマン H.M., 「ネイチャー 270」, 494-499 (1977); ケシエット E., ロズナー A., パーンスタイン Y., グレツキ M. およびアビブ H., 「核酸研究」 9, 19 (1981); ミラー W.L., マーシャル J.A. およびバクスター J.D., 「J. 生化学」 255, 7521-7524 (1980) 参照]。最近ではDNA組換え工業技術において異質のタンパク質が酵母菌の中で無性生殖され出現したことが記載されている。酵母菌の中に異質の遺伝子が出現したことの証拠は、酵母菌プラスミド媒体上のサツカロミセス・セレビジエの中に導入されたうさぎのグ

ロビン遺伝子の生体内での写しに関する研究から明らかにされた。[ベツグズ J.D., ヴァン・デ・ン・バーグ J., ヴァン・オビエン A., およびワイズマン G., 「ネイチャー 283」 835-840 (1980) 参照。]

酵母菌の中に異質の遺伝子を最大限に出現させてみようとして、遺伝子の5'-プロモーター領域、移動開始および信号ペプチド配列が酵母菌ゲノムの類似の領域と取り換えられた。ウシの成長ホルモンに関して、上記領域が酵母菌アルコールデヒドロゲナーゼ (ADHI) 遺伝子の領域と取り換えられた。完全な長さをもつた生物学的に活動的なウシの成長ホルモン分子が酵母菌の中に生成された。[ハイツツマン R.A., ハギイ F.E., レバイン H.L., ゴーデル D.V., アンマーラー G., ホール B.D., 「ネイチャー 295」 717-722 (1981) 参照。] 他のプロモーターも使用されたが、遺伝子の出現はずつと少なかった。一個の強力なプロモーターを有する能力が酵母菌の中に種々な遺伝子をかなりの水準で出現させることが

できるのに非常に役立つている。

GAL1ガラクトキナーゼ遺伝子のためのプロモーターが上記のようなプロモーターであることが発見された。さらにこのプロモーターはグルコース抑制下にある。従つて、ウシの成長ホルモン、インターフェロン、プレプロレニン、およびプロレニンを含む種々の遺伝子のいずれも酵母菌に無性生殖させ、酵母菌のGAL1プロモーターの指示により最大限に出現させることが実用化している。

本発明の目的は所望のタンパク質を出現させるために使用する酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子のGAL1プロモーターを有する遺伝子組換え物質を提供することである。

本発明のもう一つの目的はガラクトキナーゼ遺伝子以外の遺伝子が酵母菌の菌体の中に出現することを指示するためにこの遺伝子に結合したGAL1プロモーターを有するDNA分節を提供することである。

本発明のさらに別の目的はウシの成長ホルモン、インターフェロン、プロレニン、プレプロレニン、

又は他のポリペプチドをこれに相当するウシの成長ホルモン遺伝子、インターフェロン遺伝子、プロレニン遺伝子、プレプロレニン遺伝子、又は他の遺伝子に結合したGAL1プロモーターを使用して酵母菌の菌体の中に出現させる方法を提供することである。

本発明の別の目的は酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子のGAL1プロモーターに制御されて所望のポリペプチド生成物を生成するサツカロミセス・セレビジエの変種株を提供することである。

本発明の別の目的はGAL1プロモーターを使うDNA組換え工業技術により酵母の中に例えばウシの成長ホルモン、インターフェロン、プロレニン、プレプロレニンなどのような生成物を生成する方法を提供することである。

本発明により、所望のポリペプチド生成物を得るための遺伝子の出現は例えばサツカロミセス・セレビジエのような酵母菌株のGAL1プロモーターにより制御される。GAL1プロモーターは酵母菌中のガラクトキナーゼのための写し開始信号を

含むDNA分節である。GAL1プロモーターの配列情報は第一表に示される。

第 1 表

GAL125 および GAL126 の配列のリスト

10	20	30	40	50	60	70
0AATTCGACAGGTTATCAAGCAACACAAGTCATATCCATTCTCAATTAGCTCTACCACAGTGTGTGAACCAA						
80	90	100	110	120	130	140
TOTATCCAGCACCACCTOTAACCAAAACAATTTTAAAGTACTTTTCACTTTOTAACCTGAGCTGTCATTTA						
150	160	170	180	190	200	210
TATTGAATTTTCAAAAAATTCCTTACTTTTTTTTTTGGATGGACGCAAGAAAGTTTAATAATCATATTACATG						
220	230	240	250	260	270	280
OCATTACCACCATATACATATCCATATACATATCCATATCTAATCTACTATATGTTGTGTATGTAAAGAA						
290	300	310	320	330	340	350
GCCCCATTATCTTAGCCTAAAAAACCTTCTCTTTGGAACCTTCAOTAAACGCTTAACCTGCTCATTGCT						
360	370	380	390	400	410	420
ATATTGAAATACGGATTAGAAAGCCGCGGAGCGGOTGACAGCCCTCCGAAAGGAAGACTCTCTCCGTGCT						
430	440	450	460	470	480	490
CCTCTGCTTTACCGGTCGCGTTCTGAAACGCGAGATGTGCTCGCGCCGCACTGCTCCGAAACAATAAAGA						
500	510	520	530	540	550	560
TTCTACAATACTAGCTTTTATGTTATGAAAGGAAAAATTTGCAAGTAACCTGCGCCCAACAAACCTTCAA						
570	580	590	600	610	620	630
ATGAACGAATCAAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTATTTTTTAGCCTTATTTCTGCGGTAAAT						
640	650	660	670	680	690	700
TAATCAACGGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAACTGCATAACCACTTTAA						
710	720	730	740	750	760	770
CTAATACCTTTCAACATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTC				CTCTACCGGATCC [GAL126]		
				AAATGTAATAAAAAATATCAACAAAAAATT		
				750	760	770
OTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAGGAGAAAAAACCCCGGATCC [GAL125]						
780	790	800	810	820		

上記の特性を有する酵母菌株の構造は大規模な酵母発酵技術が存在するし、またサツカロミセス・セレビジエが低毒性でもあるのでポリペプチド生成物の商業的生産には特に望ましい。

ここに記載の遺伝子工学の方法によつて用意された微生物としては、メリーランド州ロツクビル市パークローン・ドライブ 12301 のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに現在預けてある培養菌が挙げられる。これらの培養菌は、コラボラティブ・リサーチ社に預けられ、次のようなものがある。

受入れ番号 20643、株名称 CGY196、

預けた日 1982年9月。

受入れ番号 20661、株名称 CGY457、

預けた日 1983年2月。

受入れ番号 20662、株名称 CGY461、

預けた日 1983年2月。

受入れ番号 20663、株名称 CGY528、

預けた日 1983年2月。

酵母菌体中の遺伝子の出現を指示するための酵

母菌ゲノムに於て異質の遺伝子に結合した GAL 1 プロモーターを含む DNA 分節が提供される。この分節は GAL 1 遺伝子を mRNA に写し、次にこの mRNA を移動させる信号を有する酵母菌ゲノムから取った 0.755、又は 0.82 キロベース DNA 分節であることが好ましい。この DNA の切片にはガラクトキナーゼの遺伝情報を指定する配列は存在しない。

酵母菌の中に所望のポリペプチド生成物を出現させる方法では、酵母菌 GAL 1 プロモーターは生体内で染色体あるいはプラスミドに含まれるこのポリペプチド生成物の遺伝子の前に挿入される。これら媒介体は菌体を別のものにするために使用され、この新しい遺伝情報はその菌体の中に保持されその子孫に伝えられる。

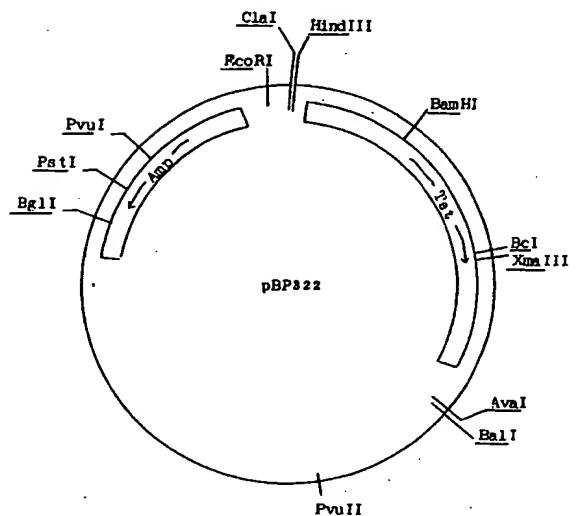
GAL 1 プロモーターを使うポリペプチド生成物の合成は次のいくつかの理由で有益である、すなわち、

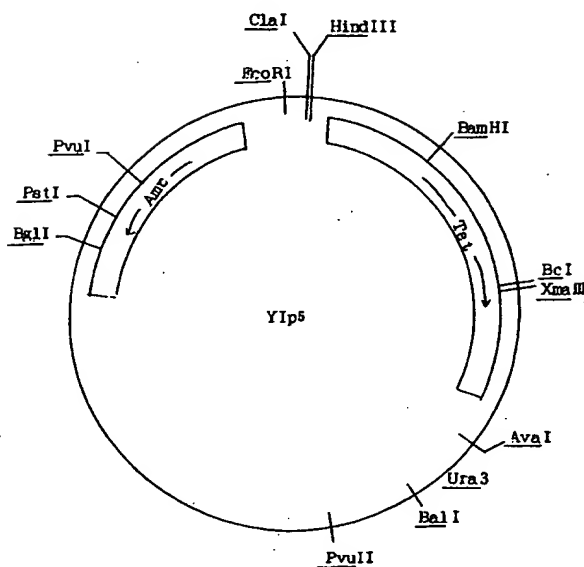
GAL 1 プロモーターは強力で、かなりの量のポリペプチド生成物の合成をもたらす。

GAL 1 プロモーター活性は、過度のポリペプチド生成物が菌体にとつて毒性があるので、ポリペプチド生成による有害な影響を及ぼさないで、酵母菌を増殖させるための酵母菌の炭素源を変えることにより調節される。

以下に詳細に述べてあるように、特別の DNA 分節は酵母菌ゲノムに於て異質の遺伝子に結合され、サツカロミセス・セレビジエの変種株に入られると、酵母菌ガラクトキナーゼ遺伝子の GAL 1 プロモーターの制御の下でポリペプチド生成物を生成する。このサツカロミセス・セレビジエは一般に新しい DNA 組換えプラスミドで変えられる。このプラスミドは、エシエリキア・コリプラスミド pBR322、酵母菌ゲノムとプラスミド DNA の および合成の DNA 連結子から取られた DNA 分節を結繋して作られた。J.G. サトリフ、「コールド・スプリング・ハーバー・シンポジウム 43」77-90(1979)によるプラスミド pBR322 の構造は第2表に図式で示されている。

第 2 表





特開昭60- 58077 (9)

一般に、外生の遺伝子と結合するプラスミドを作る場合に、結合力のある末端を形成する、あるいは導入することを含めたさまざまな技術が使われる。丸くなった末端が結合できる。もしくは、二つの鎖が別々の位置で開裂され、それぞれの端部に延長部分を残しておき結合力のある末端として役立つというような方法でプラスミドと遺伝子が開裂されてもよい。また結合力のある末端が二つの鎖の反対側の端部から核酸を取り除いて、あるいは反対側の端部に核酸を入れることによつて導入されてもよい。裂かれたDNA分節を結合するために使用される方法は、以下にも述べるように、末端の性質によつて左右される。

「丸くなった末端」とは二個の塩基が一緒になった末端を有するDNA分子を指す。(スガラメラV.、ヴァン・デ・サンデJ.H.、およびコラナH.G.「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス USA 67 1468-1475(1970)参照。) DNAの丸くなった末端は約50 μM DNA 5'-末端部の明白なkmを有するT₄ DNAリ

ガーゼによつて結合してもよい。(スギノA.、グッドマンH.M.、ハイネツカーH.L.、シャインI.、ポイヤーH.W.、およびコッツアレリN.R.、「J.生化学 252」3987-3994 (1977)参照。)

丸い末端のDNAは例えばHaeIIIのような多数の制限エンドヌクレアーゼのいずれかで開裂により生成される。さもなければ、不ぞろいな剪断、又は例えばEcoRI、HindIII、又はBamHIのような制限酵素によるくい違い切断などが使われるが、DNA末端は後で生化学的方法で丸くされなければならない。このような生化学的方法には単独成分特定ヌクレアーゼS1で培養する方法があるが、以下の記事に記載されている。すなわち、ユルブリッテA.、シャインJ.、チャーウィンJ.、ピクテットR.、タイシャーE.、ラッターW.J.、およびグッドマンH.M.、「サイエンス 196」1313(1977);マニアティスT.、ハーゲンH.C.、レイシイE.、ロウアーG.、オコンネルC.、グオンD.、シムG.K.、およびエフスト

ラティアデイスA.、「細胞 15」687、(1978);シエラーR.H.、トマスT.L.、リーA.S.、クレインW.H.、ナイルW.D.、ブリテンH.J.、およびダビッドソンH.、「サイエンス 196」197 (1977);およびチャーネイP.、ペリコデットM.、ガリパートF.、およびティオレスP.、「核酸研究 5」4479(1978)。もしくは、丸い末端はT₄ DNAポリメラーゼで培養して創り出せるし[イタクラK.、ヒロセT.、クリアR.、リッグズA.D.、ハイネツカーH.L.、ポリバーF.、およびポイヤーH.W.、「サイエンス 198」1056(1977);フレイザーT.H.、およびブルースB.J.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・USA 75」5936(1978)参照]、エシエリキア・コリDNAポリメラーゼで培養しても創り出せるし[スイバークP.H.、シャインJ.、マールシャルJ.A.、バクスターJ.D.、およびグッドマンH.M.、「ネイチャー 270」486(1977);ヘックロンF.、ソーM.、およびマツカーシーB.J.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエ

ス USA75」6012、(1978)；およびパツクマンK.、タツシユンM.、およびギルバートW.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス USA73」4174 (1976)参照)、および逆転写酵素で創り出せるが〔ユルブリツチA.、シャインJ.、チャーウィンJ.、ピクテットR.、タイシャーE.、ルツターW.J.、およびグッドマンH.M.「サイエンス 196」1313(1977)参照〕、この際デオキシヌクレオチド・トリフォスフェートを添加する。

「結合力のある末端」とは、単独鎖維の末端を有するDNA分子を指す。単独鎖維の延長は相互に補足し合い、逆平行である。〔メルツJ.E.、およびダイビスR.W.、「プロセス・ナショナル・アカデミー・サイエンス・USA69」3370-3374 (1972)参照。〕

塩基対複合体の結合が起こるのは、5'末端のヌクレオチドがリン酸塩基を有し、この反対の補足的なヌクレオチドが遊離の3'-ヒドロキシ基を有する場合である。2個のホスホジエステル結合

がほとんど同時に行われ、結合した複合体は相互に転化されるヌクレオチド配列を有する。

DNAに結合力のある末端を創造するための3種類の一般的方法がある。

1. 独自の配列のくい違い切断を導入するII型制限エンドヌクレアーゼでDNAを消化する；
2. 線状のDNA分子を末端デオキシヌクレオチド移転酵素で処理して、逸つた割合でDNA分子を有する3'-ヒドロキシル末端でのポリ(dA)とポリ(dT)あるいはポリ(dC)とポリ(dG)のいずれか一方の単独鎖維の尾部を生成する；
3. 丸い末端の分子に連結子を加えるが、これは制限エンドヌクレアーゼ開裂位置を有する短い複合体である。このような連結子はT₄DNAリガーゼ触媒化丸い末端結合によつてDNAに結合される。この連結子を開裂する制限酵素で生成物を消化した後、このDNAは結合力のある末端を有する。

これらの方法は、次の記事に例示されるように周知のことである。すなわち、サドラーJ.R.、ベツツJ.L.、ティクレンバーグM.、ゴウデルD.V.、ヤンスラD.G.、およびカルサーズM.H.、「遺伝子3」211(1978)；パールC.P.、マリアンK.J.、ウーR.、スタウインスキJ.、およびナラングS.A.「遺伝子1」81、(1976)；およびシエラーR.H.、ディッカーソンR.E.、ポイヤーH.W.、リッグズA.D.、およびイタクラK.「サイエンス 196」177(1977)。

「連結子」とは、長さが6から14の塩基対の複合した丸い末端のDNA分子のことで、結合力のある末端を生成する制限エンドヌクレアーゼの認識位置を有する。

本発明の好ましい実施態様では、プラスミドは異質の遺伝子を酵母菌体に導入するための担体としての役割を果たす。しかし、酵母菌に写しのできる分子ならどんなものでも使用できるので、プラスミドを使う必要はない。DNA分子はプラスミド以外の媒介体に結びつけられるが、当該分野で

知られているものとしてウイルス、又はコスミドが挙げられるし、あるいは、染色体に結合することもある。

組換えプラスミド、又はプラスミド・カメラは生体内で構成される。焼きなまして結聚する方法は組換えプラスミドを生成するばかりでなく、プラスミド担体を再び円形にするので、元のプラスミドと異質のDNAを含む結聚生成物の混合物が得られる。元のプラスミドとプラスミド担体および連結異質DNAから成るDNAカメラとだけならば正常に複製をすることができるであろう。この混合物がバクテリアの変形のために使用される場合は、プラスミド担体の遺伝子型と異質の遺伝子型の両方の複製ができるであろう。

バクテリア菌体の変形はバクテリア菌体の混合物に起こるが、大部分は変形しない。変形した菌体の部分のほとんどが、あるいは、ある場合は少しだけが組換えプラスミドによつて変形されたと思われる。ともかく、菌体全体のうちの極めて僅かな部分だけが所望の表現型特徴を有する。

DNAキメラ、又は元のプラスミドを含むバクテリアだけを単離するために、例えば抗生物質や重金属に対する耐性などのように元のプラスミドに選択的に作用する遺伝子標識が含有される。次に、菌体は成長抑制物質を含有する寒天培地で培養される。本発明において変形のためのバクテリアとしてエシエリキア・コリが使用されるので、その成長抑制物としてアンピシリンが使用される。耐性のある遺伝子型を有する菌体だけが生き残る。もし異質の遺伝子がプラスミド担体によつて変形した菌体とプラスミドキメラによつて変形した菌体とを識別できる表現型特性を提供しない場合には、さらに複製されたプラスミドキメラを複製されたプラスミド担体から単離する工程が必要である。工程には、菌体の溶解および従来の方法によるDNAの単離分離あるいは変形バクテリアの無作為選択およびどの菌体が分子キメラを含有しているかを測定するため変形したものからDNAを識別することなどがある。これは電気泳動、傾斜遠心分離、配列分析、又は電子顕微鏡検査などに

よつてDNAを物理的に識別することによつて行われる。

種々のクローンから菌体が集められ、これら変形物からプラスミドDNAが単離される。次に、プラスミドDNAはいろいろな方法で分析される。一方法としては、プラスミドを適切な制限酵素で処理し、得られた切片に異質の遺伝子が存在するか分析する方法がある。その他の技術方法についてはすでに述べた。

ひとたび組換えプラスミドがエシエリキア・コリに複製され単離されると、このエシエリキア・コリは培養され増殖されるが、組換えプラスミドはサツカロミセス・セレビジエ株の変形用に使用される。

本発明で使われるGAL1プロモーターという用語はPGAL1とも表示されるが、このGAL1遺伝子をmRNAに写し、次にこのmRNAを移動させるための信号を有する酵母菌ゲノムから得られた0.755あるいは0.82キロベースのいずれかのDNA配列であるのが好ましい。ガラクトキナー

ゼの遺伝情報を指定する配列はこのDNAの断片には存在しないが、この断片は異質遺伝子の出現を指示できるし、その規則はGAL1遺伝子の標識に従う。[St. ジョンT.P. およびデイビスH.W. 「J. モル・バイオロジ 152」 285-315 (1981) 参照。]

本発明で使用されるプロモーターによつて促進される前述のウシ成長ホルモン遺伝子は下垂体前葉製剤で合成された約22,000ダルトンのタンパク質である。このホルモンは成人前の成長に必要である。ウシ成長ホルモン(BGH)は、最初に26個のアミノ酸残基のアミの末端延長を有する前成長ホルモンとして合成された2個のジスルフィド橋を持つた191個のアミノ酸から成る単独のポリペプチドを含有している。[ミラーW.L., マーシャルJ.A. およびバクスターJ.D. 「J. 生化学 255」 7521-7524 (1980); ケシエットE., ロズナーA., パーンスタインY., グレッキM. およびアビブH. 「核酸研究 9」 19-30 (1980); およびリンガツバV.R., デ

ビラーシーアリーA. およびプロベルG. 「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 74」 2432-2436 (1977) 参照。]

本発明で使用されるプロモーターによつて促進される前述のインターフェロン遺伝子は以下に記載の3種類のインターフェロン遺伝子のいずれのものでよい。

(a) 白血球-白血球あるいはリンパ芽球細胞から誘導され、 $L\alpha$ IFN又はIFN- α と表示される。

(b) 線維芽細胞-線維芽細胞から誘導され、FIFNあるいはIFN- β と表示される。

(c) 免疫一分裂促進剤あるいは抗原刺激リンパ系細胞から誘導され、IFN- γ と表示される。

このようなインターフェロンについての記載は以下の文献中に見られる。

オーデルD.V., ラングD.W., ドレルT.J., グロスM., ローンH.M., マツカンドリスR., スーパーグR.H., ユルブリツチA., イエルパートンE., およびグレイP.W. 「ネイチャー 290」 20-26 (1981)。

アレンG. およびフアンタスK.H. 「ネイチャー 287」 408-411 (1980) および前出の文献。

ズーンK.C. 「サイエンス 207」 527-528 (1980)

マンティN.、シュパーツスタインM.、ストローリM.、パナムS.、ナガタS. およびワイズマンC. 「遺伝子 10」 1-10 (1980)。

ストローリM.、ナガタS. およびワイズマンC. 「サイエンス 209」 1343-1347 (1980)。

本発明の方法において、プレプロレンニンおよびプロレンニンはそれぞれプレプロレンニンDNA物質の単離によつて得られるのが好ましい。プレプロレンニンはプロレンニンの先行物質である。プレプロレンニンはNAの部分を除くことにより、プロレンニンの遺伝情報を指定する遺伝子物質を得ることができた。

本発明によるプレプロレンニンあるいはプロレンニン遺伝子はプレプロレンニンあるいはプロレ

ニンそれぞれのアミノ酸配列の遺伝子情報を指定するヌクレオチド配列から成り、プレプロレンニンあるいはプロレンニンをそれぞれ暗号に変えるゲノムDNAの中に存在する干渉ヌクレオチド配列は含まない。また、これらの遺伝子は適当な宿主細胞の中に複写する媒介体に附着して提供される。

本発明の目的のために、プロレンニン遺伝子はプロレンニン分子の遺伝情報を指定するヌクレオチドの配列であると定義されるが、このアミノ酸配列は次の文献に記載されている〔B. ホルツマン、V.B. ベダーセン、H. ヤュブソン、D. カウフマン、およびG. ウイブラント 「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 74」 2321-2324 (1977)〕。

プレプロレンニン遺伝子はプロレンニンの遺伝子情報を指定するヌクレオチドの配列を有するが、また、プレプロレンニン酵素上に見られるアミノ末端先行物質ポリペプチドの遺伝子情報を指定するヌクレオチドをさらに48個を5'-末端の位置

に有する。

本発明の好ましい実施態様において宿主細胞として使用された酵母菌株はサツカロミセス・セレビジエで、これは低毒性で周知の遺伝子特性を有するため普通に研究室で使われる菌株である。この菌株は大規模に培養するのが容易である。しかし、GAL1プロモーターを有する本発明の組換えDNA物質は、規則を変える酵母菌の突然変異体を含有するポリペプチド生成物を変形を可能にする酵母菌体中出现させるために使用される。

サツカロミセス・セレビジエは多数の発芽細胞によつて無性再生する酵母菌である。このような細胞は通常は対になつて、あるいは小さな群をなしている。この種は通常は生殖細胞が直接無性の細胞の中で生成する二倍体であるが、この種はまたより高い増殖性でも培養される。さらに、サツカロミセス・セレビジエは子のを形成するが、各子のうち1から4個の球状の生殖細胞を有する。二種の子のうは成熟しても破れない。この酵母菌は呼吸代謝作用と同様に強力な発酵作用を

有する。選ばれた菌株には蒸留酒製造業者の酵母菌とパン屋の酵母菌がある。

酵母菌の大部分は比較的一様な条件で普通の研究室用培地で培養される。酵母菌の通常発育に必要なものは次の通りである。

(a) 炭素とエネルギー用有機炭素化合物、

(b) タンパク質と核酸の合成用の有機、又は、無機窒素、

(c) 各種ミネラル(極微量の要素を供給する化合物を含む)、

(d) たびたび、ビタミンの混合物を添加。

このような発育に必要なものは酵母培養をベースにしたもの(デフコから入手できるYNB)、すなわち、多数の微量要素、9種のビタミン、より好みする酵母菌の成長を刺激する極微量のアミノ酸、およびリン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウムなどの主要ミネラルを含む化学的に定義された培地によつて与えられる。窒素源は硫酸アンモニウムである。所望の炭素源が添加されなければならないが、普通そ

の濃度は0.5-3多である。特に菌株に必要なものがあれば、この培地に添加される。培地のpHの範囲は普通pH 3-8である。好ましくは、pH 4.5-6.5である。

本発明の細胞を得るために先ず周知のDNA組換え技術を使つて所望の遺伝子物質を得て、これを宿主細胞に挿入し、その後、この宿主細胞は無性生殖される。

酵母菌の中に最後に無性生殖したい遺伝子は第一段階で第一の源からの遺伝子のメッセンジャーRNAを得ることにより単離されるのが好ましい。ウシ成長ホルモンの場合、これはウシ下垂体前葉製剤から単離して得られる。メッセンジャーRNAはデイーラー外の方法(R.G. デイーラー、J.I. ゴードン、A.T.H. パーンズ、K.P. ムリニックス、M. ビナースタイン、R.F. ゴールドパーガー、「J. 生化学 252」8310-8319(1977))により単離され、ポリA強化RNAは、R.C. デスロジャ、K.H. フリドリチ、およびF.M. ロットマン、「生化学 14」4367-4374(1975)

DNA(cDNA)を得るために使用される。RNA部分は上記方法のいずれかを使つて当該技術で周知の方法により線維を切つて、あるいはウィツケンズ外(1978)の方法により熱変性することによりきちんと並べられる。

次に、エシエリキア・コリDNAポリメラーゼIあるいはAMV逆転写酵素のような酵素を使用して、上記記載の方法およびJ.I. ゴードン、A.T.H. パーンズ、J.L. クリストマンおよびR.G. デイーラー、「J. 生化学 253」8629-8639(1975)に記載の方法により、cDNAを二重線維DNAに変換する。

第三に、合成連結子が従来の方法によりHind IIIあるいはEcoRI合成オリゴヌクレオチド連結子を使用して二重線維DNAの両端に付けられるが、従来の方法としては例えば次のようなものがある。すなわち、R.H. シエラー、T.L. トマス、A.S. リー、W.H. クレイン、W.D. ナイルス、R.J. プリテン、およびE.H. ダビッドソン「サイエンス 196」197-200(1977)、T.H. フレイ

に記載の方法によりオリゴ(dT)セルロースでクロマトグラフィ分析をして得られる。

次に、このメッセンジャーRNAは従来の方法により二重線維DNAに変えられる。まず、DNAの見本がAMV逆転写酵素を使用するような従来の組換えDNA方法によつてメッセンジャーRNAから作られる。例えば、A. エフストラティアイス、F.C. カフアトス、A.M. マクサム、およびT. マニアティス、「細胞 7」279-288(1976)、R. ヒグチ、G.V. パドック、R. ウォール、およびW. サルサー、「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 73」3146-3150(1976)、D.L. カシアン、およびJ.C. メイヤー「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 73」2191-2195(1976)、M.P. ウイツケンズ、G.N. ブーエル、およびR.T. シムク「J. 生化学 253」2483-2495(1978)、G.M. ワール、H.A. ペジエットおよびG.R. スタック、「J. 生化学 254」8679-8689(1979)に記載の方法がコピー

ザーおよびB.J. ブルース「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 75」5936-5940(1978)、A. ユルブリッチ、J. シャイン、J. チャーグイン、R. ピクテット、E. タインヤー、W.J. ルツターおよびH.M. グットマン、「サイエンス 196」1313-1319(1977)、J. シャイン、P.H. スイパーグ、J.A. マーシャル、J.D. バクスターおよびH.M. グットマン「ネイチャー 270」494-499(1977)、又はP.H. スイパーグ、J. シャイン、J.A. マーシャル、J.D. バクスターおよびH.M. グットマン「ネイチャー 270」486-494(1977)。

第四に、DNA分子は染色体に合成されるか、あるいは当該技術で周知のプラスミド、ウイルス、又はコスミドなどの媒介体に付けられる。このような媒介体には次のようなものがある。

pBR322(F. ボリバー、R.L. ロドリグズ、P.J. グリーン、M.C. ベトラツチ、H.L. ヘイネカー、H.W. ボイヤー、J.H. クロサ、S. フォルコウ、1977「遺伝子 2」95-119)

pMB9 (R.L. ロドリグス、F. ポリバラ、H. M. グットマン、H.W. ボイヤー、M.C. ペトラツチ「遺伝子出現の制御における分子機構」(D. P. ニールリツチ、W.J. ラツター、C.F. フォックス編集) 471アカデミック出版ニューヨーク、1976)

pSC101 (S.N. コーヘン、A.C.Y. チヤング、H.W. ボイヤー、R.B. ヘリング1973「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA70」 3240)

λ gtWES (D. テイミエ、L. エングイスト、P. レダー「ネイチャー263」526-527(1976)

λ シヤロンフエイジ (F.R. プラットナ、外「サイエンス196」161-169(1977)

f1R229 (J.D. ボエク「分子一般遺伝学181」 288-291)(1981)

pJ075-58 (J. コリンズ「酵素化学の方法68」309-326)(1979)

この工程は再び最終宿主細胞の外側で行われる。この方法の役に立つ技術は以下の記載と同様に述

結子に関する上記文献に記載されている。すなわち、V. ハーシフィールド、H.W. ボイヤー、G. ヤノフスキ、M.A. ロベツト、およびP.R. ヘリンズ「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA 71」3455-3459(1974)、N.E. ムレイおよびK. ムレイ、「ネイチャー251」476-482(1974)、F.R. プラットナー外「サイエンス196」、161-169(1977)。

第五工程では、DNA組換え分子は宿主細胞系の細胞質に従来の方法を使つて導入されるが、この方法については以下の記事に記載されている。すなわち、M. マンデル、およびA. ヒガ(1970)「J. 分子生物学 53」159-162、P.C. ウェンズイック、D.J. ファイネガン、J.E. ドネルソンおよびD.S. ホグネス「細胞3」、315-325(1974)、S.N. コーヘン、A.C.Y. チヤングおよびL. スー「プロセス・ナショナル アカデミーサイエンス USA69」2110-2114(1972)、H.M. グッドマン、およびR.J. マクドナルド「酵素化学の方法68」75-90(1979)、E.M.

レダーバークおよびS.N. コーヘン、「J. バクテリア119」1072-1074(1974)。

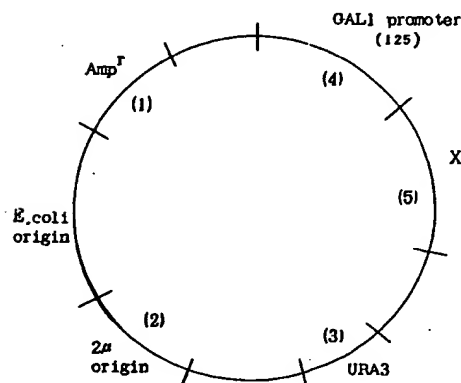
正確なクローンであることの認識は交雑選択の方法あるいは合成オリゴヌクレオチドで精査することにより行われる。(T. タニグチ、Y. フジイ、クリヤマ、およびM. ムラマツ、「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA77」 4003-4006(1980)、R.P. リツキヤルディ、J.S. ミラーおよびB.E. ロバーツ、「プロセス ナショナル アカデミーサイエンス USA76」 4927-4931(1979)、D.L. モントゴメリ、B.D. ホール、S. ギラン、およびM. スミス「細胞14」673-680(1978)。

次に、新しく変えられた宿主細胞は無性生殖され、所望の物質が出現した。例えば、ラクトース・オペロン・プロモーターを使うガレンテ外の方法で(1980)(L. ガレンテ、G. ローアー、T.M. ロバーツ、およびM. タツシン「細胞20」 543-553(1980)、L. ガレンテ、T.M. ロバーツ、およびM. タツシン「科学209」1428-

1430(1980))、異質のDNAを出現させこれを最も効果的に活用する。

本発明において、DNA分節をプラスミド構造に並べたものが第4表に図式的に示される。

第 4 表



この構造は、例えばエシエリキア・コリ、又は酵母菌のいずれか一方の中に保持されるプラスミドなどの「シャトル」媒介体で一般に使用されるいくつかの成分から成る。第4表に記載のプラスミドは、K. ストルール、D. T. ステインチコム、S. シャーラー、および R. W. デイビス「プロセス ナショナル アカデミー USA76」1035-1039(1979)に記載のプラスミド YI_p5 の変形構造である(第3表参照)。分節(1)はプラスミド $pBR322$ の2.4キロベース断片で、DNA複製元と β -ラクタマーゼ遺伝子を含有し、DNAをエシエリキア・コリに増殖させ、アンピシリン耐性によりDNAを選択的に存在させ続けることができる。分節(2)は酵母菌の中に最初に写しを開始する位置を有する酵母菌2 μ プラスミドの1.6キロベースのHpa IからHind IIIまでの断片である。[2 μ プラスミドについては、J. L. ハートレイおよびJ. E. ドネルソンにより「ネイチャー 286」860-865(1980)に記載されている。]分節(3)は酵母菌ゲノム(1.1 kbの長さ)からの

URA3遺伝子で、宿主株中の $ura3^-$ の変形を補足するおかげでプラスミドを有する酵母菌を選択することができる。[URA3遺伝子については、M. バッハ、F. ラクロート、およびD. ポットスタインにより「プロセス ナショナル アカデミー サイエンス USA76」386-390(1979)に記載されている。]

分節(4)は、GAL1遺伝子をmRNAに転写し次にこのmRNAを移動させる信号を有する酵母菌ゲノムから得られたDNAの0.755 kb、又は0.82 kbの断片である。このGAL1遺伝子は酵母菌が強化グルコース培地で培養される場合は抑制される。ガラクトキナーゼの遺伝情報指定配列は0.755 kb、又は0.82 kbの断片には存在しない。これらDNAの切片は異質の遺伝子の出現を指示でき、その規則はここに記載の通りGAL1遺伝子の様態に従う。

分節(5)は所望のポリペプチド生成物配列を暗号化するDNAの断片である。このDNA切片は一定の方向を向いているので、mRNAの転写はGAL

1 プロモーターによつて制御される。信号ペプチドの遺伝情報を指定する配列は取り除かれ、ATG移動開始コドンが挿入された。従つて、メチオニンによつて開始される遺伝子は研究用に使われる。

プラスミドは各種源および合成連結子からDNA切片を結繋して構成される。0.82 kbのGAL1プロモーターと異質の遺伝子の配列の結合点での配列は次のとおりである。

(1) P_{GAL1} -A₆CCCGGATCTCGACC-ATG-X
(Xは異質遺伝子である。配列TCGACCは合成Sal I連結子の一部であり、CCCGGATCはBam H I連結子の一部である。)

0.755 kbのGAL1プロモーターと異質の遺伝子の配列の結合点での配列は次のとおりである。
 P_{GAL1} -TTATTGCTCTACGGATCAA-ATG-X
(Xは異質の遺伝子である。)

プラスミドはまずエシエリキア・コリの中で無性生殖され増殖され、次に酵母菌の中で変形される。出現規準が類似の構造を使う各種遺伝子に関して測定された。ウシ成長ホルモンの場合は、例

えば、ウシ成長ホルモン $lacZ$ の融合遺伝子は第3図でウシ成長ホルモン遺伝子に(X位置で)とつて代わつた。この構造は本質的にウシ成長ホルモンの全配列を有し(N-末端用の4アミノ酸の遺伝情報を指定する配列だけが欠けている)、ほとんど完全な $lacZ$ 遺伝子を有する。 β -ガラクトシダーゼ($lacZ$ 遺伝子生成物)活性を監視したところ、ほぼ80,000分子の融合タンパク質が菌株CGY150(α leu2-3 $ura3-52$ GAL^+)中の細胞1個につき生成された。

酵母菌の中でポリペプチド生成物を生成する場合に許可できる変更は次のとおりである。

- ・適う末端材が使用できる。
- ・ウシ成長ホルモンに関して、N-末端アミノ酸はウシ成長ホルモンにとつて異種であり、フェニルアラニン(Phe)およびアラニンの両方が観察された。この異種混成は先行物分子(前成長ホルモン)の不明確な処理法の結果である。上記の遺伝子はPhe-BGHの遺伝情報を指定する。Ala-BGHの他の遺伝子も出現のために使

用できる。

- GAL1プロモーターの突然変異体(第4表の要素(4))は出現の規準あるいは規則の標題に影響を与えることができる。染色体のゲノム中の他の突然変異体も同じ効果がある。事実、GAL1プロモーターが構成を開始させるのに役立つ突然変異体もある。このような菌株はより高い出現規準を得るために使用される。
- 異質の遺伝子に連結した P_{GAL1}を有するDNA分節(第4表の要素(4)および(5))は臨時染色体プラスミド上にこの分節を置くことによりむしろ安定した構造を得るために酵母菌染色体中に合体される。
- 異質の遺伝子中のATG開始コドンは信号ペプチドの遺伝情報を指定する配列などのような他の配列と取り換えられる。さらに、タンパク質が酵母菌体から培地へ分泌された。
- いろいろ長さや配列の違ったDNAがGAL1プロモーターと異質の遺伝子配列の結合点で生成の水準を最も効果的に活用するために使用され

る。例えば、配列(1)は次のように変えられた。

(1) P_{GAL1}-A₆CCCCGCAAGCTTATGX-ATG-X、

この領域の他の配列は突然変異誘発を行うことにより誘導される。

- 種々の長さのGAL1プロモーターが使用できる。
- 酵母菌ゲノムからの転写用の末端材はウシ成長ホルモンのC-末端に加えられる。
- ここに使われているGAL1プロモーターの用語は、酵母菌中にガラクトキナーゼの出現をうながす作用をする0.755あるいは0.82キロボースのDNA配列の部分を目指す。

ここに記載の酵母菌株は、培地にガラクトースが含まれる場合に所望のポリペプチド生成物を生成する。培地には6.7g/lの酵母窒素基剤、2%のガラクトース、および適切なアミノ酸が含まれる。もしそのポリペプチド生成物が宿主株に有害であるとわかつたら、酵母菌を2%のグルコースと6.7g/lの酵母窒素基剤を含有する培地で培養し、次にその酵母菌をガラクトース培地に移して培養を止めた後でポリペプチド生成物の製造

を誘発することによつて、ポリペプチド生成物の生成を抑制することができる。細胞は遠心分離され、細胞のない抽出液はガラスのビーズで激しくかき回わして細胞をくだいて得られる。

例 1.

牛の成長ホルモンの製造

1. 牛の成長ホルモンmRNAの単離

牛の脳下垂体が牛の屠殺直後に集められて、それをドライアイスで直ちに凍結した。50mMのTris-HCl, pH 7.5, 8MのグアニジンHClおよび1mMのジチオスレイトールとから成る200mlの冷緩衝液(10℃)の中にWaringブレンダーを使用して14.4gの組織を粉碎して入れた。このようにして得られた溶液を再び、10,000rpmのSorval SA600ローター中で5℃の温度で17分間遠心分離した。分離した物質を再分散して均質化し、それは20mMの醋酸ソーダと2.0mMのEDTAとから成る40mlの冷緩衝液中で1時間水を入れて静置された。それからその液はその半量の氷冷100%エタノールで処理した。

-20℃で1時間放置後、沈殿物は-10℃の温度で30分間3000rpmの遠心分離を行つてペレット化した。このペレットは20mlの前述の緩衝液の中に2個再分散され、次にその半量の氷冷100%メタノールで処理され、その後-20℃で1時間培養された。ペレットは前述の方法で集められた。この最終ペレットを8mlの0.1M EDTA中に60℃で加熱しながら再分散し、次に0.1容積の2M醋酸ソーダ、pH 5.0と2容積の氷冷100%エタノールとを加え、この溶液を-20℃で一晩放置した。このRNA沈殿物は-10℃の温度で20分間の8000rpm遠心分離によつて集められて、次にそれを5mlの水に溶解した。収量は5μg RNAであつた。このRNA溶液は5mlの2倍濃厚結合緩衝液(20mMのTris-HCl, pH 7.5; 2mMのEDTA, pH 7.0; 0.4% SDSおよび0.24M NaCl)で希釈した。このRNA溶液を1.5mlのオリゴ-dT-カラムに通した。このカラムを1倍濃厚結合緩衝液で洗脱した後、ポリA含有RNA(mRNA)をNaClを

含まない緩衝液によるカラム洗脱によつて溶出した。約100μgのポリA含有RNAを得た。このポリA含有RNAの一部をガラス管中で兎の網赤血球溶解物系〔Pelham, H.R.B.およびJackson, R.J., 欧州生物化学雑誌, 67, 247-256(1976)〕中において翻訳して牛の成長ホルモンを指定するmRNAの単離を確認した。

2. 二重に燃られたコピーDNA(cDNA)の製造

ポリA含有RNAから、それを50mMのトリス-HCl, pH 8.3; 100mMのKCl; 8mMのMgCl₂; 0.4mMのデチオスレイトール; 各5mMのdATP, dGTPおよびdTTP; および100単位の逆転写酵素および1.3μCi/μl-³²P-dCTP(1.8Ci/mモル)を含有する20μg/mlのオリゴ(-dT)₁₂₋₁₈とから成る液の中で42℃で1時間保温することによつて、約2.5μgのcDNAが合成された。この反応混合物を100℃で3.5分間加熱し、次にそれを約3分間水で急冷し、次に沈殿した蛋白を遠心分離して除いた後、その上澄み液にHEPES-NaOH, pH 6.9を100mM

まで; MgCl₂を5mMまで; デチオスレイトールを0.5mMまで; およびデオキシヌクレオシド三磷酸エステルを0.125mMまでそれぞれ加えた。この液と300単位の大腸菌DNAポリメラーゼIとの混合物を15℃で2.5時間培養すると1.8μgの二重に燃られたcDNAを生成した。このDNAをフェノールで抽出し、次にSephadex G-100上のクロマトグラフィー(13.5mlのカラム, 0.7cm×35cmを使用, 20mMのNaClで溶出)でこの生成物にとりこまれていない三磷酸エステルから生成物DNAを分離し、次に1/10容の2Mの醋酸ソーダ, pH 5と2.5容の冷エタノールとを生成物溶液に添加して-20℃の温度にして一晩かけてこのDNAのエタノール沈殿を行つた。この二重に燃られたcDNAは次に緩衝液(0.3MのNaCl, 30mMの醋酸ソーダ, pH 4.6および3mMのZnSO₄とから成る)の中で37℃で8000単位のS₈ヌクレアーゼを用いて1時間処理された。この反応はEDTAを10mMまでさらにトリス-HCl, pH 8.3を200mM

まで添加して停止され、その混合物は平衡させられたビオゲルA-150mカラム(0.75cm×40cm)に通して吸着させ、次にそれを10mMのトリス-HCl, pH 7.5と250mMのNaClと1mMのEDTAとで溶離した。高分子量のDNAの複数のピークフラクション(各0.5ml)はプールされて、それに1/10容の2Mの醋酸ソーダ, pH 5と2.5倍容の冷100%エタノールの添加によりDNAのエタノール沈殿が行われた。

3. EcoRI リンカーの添加

S₈処理した二重に燃られたcDNA(0.21μg)を緩衝液(60mMのトリス-HCl, pH 7.5; 8mMのMgCl₂; 5mMのデチオスレイトール; 1mMのATPおよび5mMの各デオキシヌクレオシド三磷酸塩)の中で9単位の大腸菌DNAポリメラーゼとともに10℃で10分間培養し、その後氷上で冷却した。この「鈍い端末を有する」(blunt-ended)二重に燃られたcDNAは次に、65mMのトリス-HCl, pH 7.5; 6mMのMgCl₂; 5mMのデチオスレイトール; 1mMの

ATPの中で、160pモルの³²P-置換識別されたEcoRI合成リンカー(cDNA端末より100x過剰)および4「鈍い端末」単位のT₄DNAリガーゼとともに15℃で5時間培養され、次に氷上で冷却され、次に100mMのトリス-HCl, pH 7.5, 50mMのNaClおよび5.6mMのMgCl₂との中でEcoRI限定内ヌクレアーゼ(ニューイングランドバイオラボ、9単位)を用いて37℃で4時間45分処理され、次にフェノール抽出された。この抽出物はビオゲルA-150mカラム(0.7cm×31.5cm)上で分溜された。高分子量のDNAを含む複数の溜分(各0.5ml)はプールされ、次にエタノール沈殿が行われた。

EcoRI 経集末端を有するこの二重に燃られたcDNAは、EcoRI 限定内ヌクレアーゼで切り開かれていた流動性のファージCGF4の二重に燃られたDNAに結着され、次にそれはH. goodman およびH.J. McDonaldの方法〔goodman, H.M. およびMacDonald, R.J., 酵素学の方法, 68, 75-91(1979)〕によつて子牛の腸のアルカリ性病

酸酵素を用いて処理されて末端の磷酸エステルが除かれた。その結聚反応には60 mMのトリス-HCl, pH 7.5; 6 mMのMgCl₂; 7 mMのデチオスレイトール; 0.12 μgの二重に撚られたcDNA; 1.2 μgのCGF₄ DNA; 0.5 mMのATPおよび450 聚集端単位のT₄ DNAリガーゼが含まれた。結聚反応は15℃で19時間であった。

4. 組換えCGF₄ DNAによる大腸菌DB4548のトランスフェクション

大腸菌株CGE6 (DB4548; hsdR⁻, hsdM⁺, supE, supF, B₂⁻, met⁻)を150 mlのtrypton肉汁中で37℃で振動しながら成長させ、OD₇₀₀ = 0.5で4℃の温度での10分間の7000 rpmの遠心分離でそれを収獲した。その細胞は70 mlの氷冷50 mMのCaCl₂中に再分散して、0℃で30分間静置した。この懸濁液は次に4℃で10分間7000 rpmで遠心分離して、さらに分離した細胞を3 mlの氷冷50 mMのCaCl₂中に再分散した。0℃で2時間そのまま放置された後、細胞はトランスフェクションに使用された。50

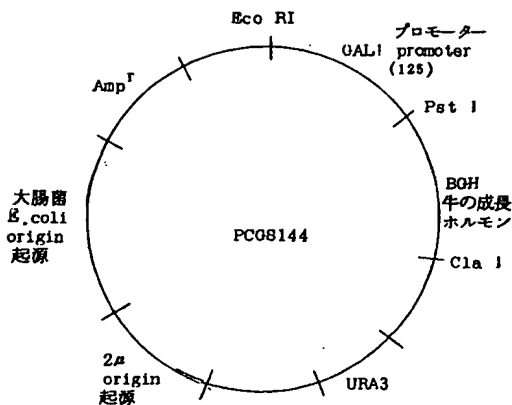
mMのトリス-HCl, pH 7.5中の結聚反応液の1:40希釈液の1 μlか2 μlのいずれかを、50 mlの滅菌した50 mMトリス-HCl, pH 7.5を入れた12本のチューブのおのおのの中に入れた。あのCaCl₂処理した細胞の1/10 mlを上のおのおののチューブに加え、その混合物は30分間氷上に置かれた。次にそれを2分間37℃に加熱後、終夜培養されたCGE5 (JM101; J. Messing (1979), V (lac pro) SupE thi⁻ バックグラウンド中のF' traD36 proAB lac IZVM15) の0.2 mlと0.7 %のソフト寒天培地の3 mlとがそれに加えられた。次にその混合物はtryptone 寒天培地板の中に注がれた。それを終夜37℃で培養したところ、3000以上のプラクを生じた。

5. 牛の成長ホルモン記号系列を保持する組換えCGF₄の同定

プラクはニトロセルローズに移され、BentonおよびDavisにより [Benton, W.D. および Davis, R.W. Science 196, 180-182

(1977)] 述べられたとおりに³²P-置換識別された牛の成長ホルモンcDNAを用いて探られた。cDNAプローブに強く雑種繁殖するフアージを板よりつまみあげ、TY培地中で貯えた。健全なフアージのサンプルはCGE5細胞上で終夜成長させて増強され、遠心分離によつて収獲し、次にそれは、0.37 Mのトリス-グリシン、pH 9.5を含みさらに0.2 N NaOH中で1時間処理し、0.5 Mのトリス-HCl, pH 7.4中で中和したあとのエジニウム臭化物で着色した0.6 %のアグロズゲル中で電気泳動にかけられた。泳動はフアージDNAの大きさのログに逆比例し、それは、600~1200の基本対の大きさをもつ牛の成長ホルモンDNA挿入物を保持する約45種類のフアージの選別を可能にした。一重に撚られたDNAが堀内らの方法 [堀内, K., Vovis, G.F. および Zinder, N.D., 生物化学雑誌, 249, 543-552 (1974)] により作られ、混成物の選別が行われた。溶離されたRNAは網赤血球溶解物系中でPelham および Jackson の方法 [Pelham,

H.R.D. および Jackson, R.J., 欧州生物化学雑誌, 67, 247-256] によつて翻訳され、そのたん白質生成物の分析により真正の免疫沈殿性牛成長ホルモンの生成が明らかにされた。2重に撚られたRFIDNAがそのフアージからMosesらの方法 [Moses, P.B., Bocke, J.D., 堀内, K. および Zinder, N.D., Virology, 104, 267-273 (1980)] により作られた。各DNAをEcoRI および PstI 限定内ヌクレアーゼを用いて切断し、得られた破片をアグロズゲル上で分析してその挿入物はPstI 部位を含むことを確認した。約350基本対のセグメントを有するある一つ (bp) のフアージDNAを選択してそれを更に検討した。DNA挿入物が表6に示すようにMaxam および Gilbert の方法 [Maxam, A.M. および Gilbert, W., 酵素学の方法, 68, 499-560 (1980)] によつて順序どおりに並べられた。

表 5

張 6

-26 MET met ala ala gly pro arg thr ser leu leu ala phe ala leu
 ATG ATG GCT GCA GGC CCC CGG ACC TCC CTG CTC CTG GCT TTC GCC CTT
 -110 EcoRI PstI
 -10 leu cys leu pro trp thr gln val val gly ala phe pro ala met ser leu ser gly leu phe ala asn ala val leu arg ala gln his
 CTC TCC CTG CCC TGG ACT CAG GTG GTG GGC GGC TTC CCA GCC ATG TCC TTG TCC GGC CTG TTT GGC AAC GCT GTG CTC CGG GCT GCT GAC CAC
 -30 PstI HaeII(HaeI)
 leu his gln leu ala ala asp thr phe lys glu phe glu arg thr tyr ile pro glu gly gln arg tyr ser ile gln asn thr gln val
 CTG CAT CAG CTG GCT GCT GAC ACC TTC AAA GAG TTT GAG GTC ACC TAC ATC CCC GAG GGA CAG AGA TAC TCC ATC CAG AAC ACC CAG GTT
 PvuII HbaI
 ala phe cys phe ser glu thr ile pro ala pro thr gly lys asn glu ala gln gln lys ser asp leu glu leu leu arg ile ser
 GCC TTC TCC TTC TCT GAA ACC ATC CGG GCC CCC ACC GGC AAG AAT GAG GCC CAG CAG AAA TCA GAC TTG GAG CTG CTT CCC ATC TCA
 leu leu ile gln ser trp trp leu gly pro leu gln phe leu ser arg val phe thr asn ser leu val phe gly thr ser asp arg val
 CTC CTC ATC CAG TCG TGG CTT GGG GGC CTG CAG TTC CTC ACC AGA GTC TTC ACC AAC AOC TTT GTT TTT GGC ACC TCG GAC CTT GTC
 ApaI PstI
 glu lys leu lys asp leu glu glu gly ile leu ala leu met arg glu val glu asp gly thr pro arg ala gly gln ile leu lys gln
 GAG AAG CTG AAG GAC CTG GAG GAA GGC ATC CTG GCC CTG ATG CGG GAG GTT GAA GAT GGC ACC CCC CGG GCT GGG CAG ATC CTC AAG CAC
 thr tyr asp lys phe asp thr asn met arg ser asp asp ala leu leu lys asn tyr gly leu leu ser cys phe arg lys asp leu his
 ACC TAT GAC AAA TTT GAC ACA AAC ATA GGC AGT GAC GAC GCG CTT CTC AAG AAC TAC GGT CTG CTC TCC TCC TTC CGG AAG GAC CTT CAT
 lys thr glu thr tyr leu arg val met lys cys arg arg phe gly glu ala ser cys ala phe RND
 AAG ACG GAG ACG TAC CTG ACG GTC ATG AAG TCC CGC GGC TTC GGG GAG GCG ACG GAT TCC GGC TTC TAG TTGCGACGCATCTGTGTGTGTGCGGCTCGCGG
 PvuII
 GTGCTTCTCTTGAACCTCGAAGGTGCCACTGCCACTGTCTTTTCTCTAATAAAATGAGGAAATTCATGCG(A)n
 677

6. サツカロミクスセレグイジエ中の牛の成長ホルモンの表示

表5に見られるとおり酵母中の牛の成長ホルモンの表示をつかむのを容易にするよう考案された遺伝子副体 pCGS144 が組立てられた。酵母中に牛の成長ホルモンを生成するため、ATG開始コードンが最初のアミノ酸(フェニールアラニン)の5'-側にとりこまれた。HaeIIは最初のコードンの3'-側で切断するという事実にもとづいて、Pheコードンの5'-端を開くためHaeII消化が行われた。6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 6.6 mM のNaCl; 6.6 mM のMgCl₂ および 6.6 mM のデチオスレイトールの中で0.5 mM のdATPの存在の下でDNAを4単位大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenow断片)を使用して室温で30分間処理してその懸集端を揃えて整えた。それからS₁ヌクレアーゼを用いて鈍い端末を有するようにした。

ATG開始コードンを含有するC_{la}I合成リンカー(CATCGATG)が、6.6 mM のトリス-

HCl, pH 7.5; 10 mM のMgCl₂; 10 mM の2-メルカプトエタノール; 500 pモル³²P-C_{la}Iリンカーとともに1 mM のATP; 4 pモルのDNA(20 μg)および4鈍い端末単位のT₄DNAリガーゼを含む液の中で17℃で終夜、その鈍い端末の断片に結集された。この結集はATG開始コードンを作り出し最初のコードンTGTを復活させた。ClaIポリリンカーは、10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM のMgCl₂ および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μlの反応液中で37℃で20単位の限定内ヌクレアーゼC_{la}Iを用いてこの断片を3時間処理して、とり除かれた。得られた断片は遺伝子副体(プラズミド)pBR322のC_{la}I部位にクローンされた。このプラズミド(遺伝子副体)(10 μg)は、10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM のMgCl₂ および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μlの反応液中で限定内ヌクレアーゼC_{la}I(ニューイングランドビオラボ, 20単位)を用いて37℃2時間で

切断された。限定切断プラズミドの調剤はフェノール抽出され次にエタノール沈殿され、次にそれはH. GoodmanおよびR.J. MacDonaldの方法[Goodman, H.M. およびMacDonald, R.J., 酵素学の方法, 68, 79-91(1979)]により小牛の腸の磷酸酵素で処理されて末端の磷酸エステルが除かれた。約0.5 pモルのC_{la}I処理断片と0.3 pモルのC_{la}I切断プラズミドとは、6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 6 mM のMgCl₂; 10 mM のデチオスレイトール; 1 mM のATP およびT₄DNAリガーゼ(ニューイングランドビオラボ, 300単位)を含有する20 μlの反応液中で15℃で3時間互に結集されてプラズミドpCGE27を作りだした。

形質転換の能力のある大腸菌株CGE43(LG90; F' V(lac-pro XIII)が、CGE6に対して前に述べたとおりにして作られた。5 μlの結集されたDNAが200 μlのその細胞を0℃で30分間混合され、次に37℃で2分間熱処理され、次に室温で10分間培養されてから新鮮なトリプト

ン肉汁で5倍に希釈された。37℃で振動しながら30分間培養後、細胞はアンピシリン(20 μg/ml)を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが選り出されてプラズミドDNAが製造されて限定酵素消化によつて分析された。これらの判定規準によつて数個の細胞は希望のプラズミドpCGE27を保持していた。10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM のMgCl₂; 60 mM のNaCl; および0.1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する20 μlの反応液の中で、プラズミドpCGE27 DNA(10 μg)が限定内ヌクレアーゼHind III(コラボラチブ研究会社、12単位)を使用して37℃で2時間切断された。このDNAは次に、100 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 10 mM のMgCl₂; 50 mM のNaCl; および1 mg/mlの牛の血清アルブミンを含有する反応液中で、内ヌクレアーゼEcoRI(コラボラチブ研究会社、15単位)を用いて37℃で3時間消化された。この限定切断DNAは、前述のように0.5 mM の

dTTPの存在下に大腸菌DNAポリメラーゼI (Klenow断片)を用いて端末を揃んで飽えられさらにS₁ヌクレアーゼを用いて鈍い端末を有するものにされた。このDNAは次にフェノール抽出され次にエタノール沈殿され、次にそれは水に再溶解されてから予備の水平の1.5%アガロースゲルに加えられた。そのゲルは、40 mMのトリス-アセテート、pH 7.2中で2-3時間電気泳動後、エシジウム臭化物で着色して長波長紫外光線を使つて検査された。この消化されたDNAはグルピースを凍結してから解かすこと〔Thuringら、分析生化学, 66, 213(1975)〕によつて抽出された。このDNA断片はエタノール沈殿され次に水に再溶解された。pBR322のEcoRI/PvuII部位に挿入されたPlacの95基本対を含むプラズミド(pGL101; 2.0 μg)が限定内ヌクレアーゼPvuII (ニューイングランドビオラボ, 24単位)を使用して37℃で6分間切断された。この限定切断DNAはフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解さ

れた。このPvuIIで開かれたベクトル(保菌生物)はゲル電気泳動により分析され、ゲル(上を見よ)から切り取られた。牛の成長ホルモンを指定する前述のDNA断片の約0.25 pモルが、66 mMのトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mMのMgCl₂; 10 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATPおよびT4DNAリガーゼ(ニューイングランドビオラボ, 300単位)を含有する20 μlの反応液中で14℃で4時間PvuII部位で開けられたプラズミドpGL101(上を見よ)中に結紮された。形質転換の能力のある大腸菌株CGE43細胞が上述と全く同様にして調製された。あの結紮されたDNAの5 μlがこの細胞の100 μlと0℃で30分間混合され、次に37℃で2.5分間熱処理され、次に新鮮なトリプトン肉汁で10倍に希釈された。この細胞は振動しながら37℃で30分間培養後、アンピシリン(20 μg/ml)を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが選出されてプラズミドDNAが作られ、次にその正しい定位が限

定酵素消化によつて分析された。これらの判定基準によつて数個の株は希望されたプラズミドpCGE22を保持していた。このプラズミドはP_{LAC}-Phe-牛成長ホルモン遺伝子を含有した。プラズミドpCGE22を上のとおり限定内ヌクレアーゼPvuIIおよびPstIを用いて37℃で部分切断することによつて、このプラズミド(30 μg)から牛の成長ホルモン用遺伝子含有の断片を単離した。この限定切断DNAはフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解されてから予備の0.5%アガロースゲルに加えられた。そのゲルは、40 mMのトリス-アセテート、pH 7.2中で電気泳動後、それはエシジウム臭化物で着色し、次に長波長紫外光線下で試験した。バンドが切り取られそのDNAは、グルピースを凍結してから解かすこと〔Thurningら、分析生化学, 66, 213(1975)〕によつて、抽出された。このDNA断片はエタノール沈殿され次に水に再溶解された。このPvuII/PstI断片の約0.5 pモルが、P_{LAC}/Z'領域に隣接した

EcoRI部位およびPstI部位で開かれたプラズミドpCGE41中に結紮された。EcoRI部位は大腸菌DNAポリメラーゼIで充填されていた。結紮反応は、66 mMのトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mMのMgCl₂; 10 mMのデチオスレイトール; 1 mMのATPおよびT4DNAリガーゼ(コラボラティブ研究会社, 10単位)を含有する20 μlの反応液中で14℃で2.5時間行われた。この結紮されたDNAは、望まれたプラズミドのpCGE51を含有することが確められた要求にかなう大腸菌細胞の形質転換するために使用された。

プラズミドpCGE27がClnI限定酵素を用いて切断され、得られた断片はS₁ヌクレアーゼを用いて鈍い端末を有するものにされた。SalI合成リンカー(GGTCGACG)がこの鈍い端末を有する断片に結紮された。20単位の限定内ヌクレアーゼSalIによる処理によつてSalIポリリンカーがとり除かれた。それは次にPstIを用いて切断された。得られた断片はpGE51のPstI/XhoI牛成長ホルモン'Z断片とともに前述した

ように酵母の連続往復式ベクトル(保菌生物) pCGS40の中にクロンを発生させられた。

プラスミドpCGS40は、大腸菌中の選別のためのDNA応答根源およびβ-ラクトマーズ遺伝子とを含有するpBR322の大部分を含んでおり、一方酵母2μプラスミドの1.6キロベース断片は酵母中の応答の開始部位を含んでおり、酵母の染色体のDNAからの1.1キロベース断片は酵母の選別のためのURA3遺伝子を保持しており、さらに酵母の染色体のDNAからの0.9キロベース断片は酵母転化酵素遺伝子のSUC2プロモーターを含んでいる。このプラスミドpCGS40は60μgのプラスミドpRB118を最初に切断すること〔Carlson, M. および Botstein, D., 細胞, 28, 145-154(1982)〕によつて作られた。そしてその切断は限定内ヌクレアーゼHindⅢを用いて37℃で30分間行われ次に限定内ヌクレアーゼEcoRI(上を見よ)を用いてさらに行われた。この限定切断DNAはフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解してからゲ

ル電気泳動を行つて精製された。SUC2遺伝子のプロモーターを含有するこの消化されたEcoRI対HindⅢ0.9キロベースバンドは切り取られ、そのDNAはガラスビードによつて抽出された。〔Vogelstein, B. および Gillespie, D., PNAS, 76, 615-619(1979)。〕

SUC2プロモーターを含有するこの0.9キロベースDNA断片は、プラスミドYIP5(URA3遺伝子の存在によつて酵母用に選択されてその中に保持されあるいはAmp遺伝子の存在によつて大腸菌用に選択されてその中に保持されることが出来る連続往復式ベクトル)の上に載せられた。結聚および形質転換後に得られた生成プラスミドpCGS46は精製され、その構造が確認された。プラスミドpCGS40は限定内ヌクレアーゼPvuⅡを用いてプラスミドpCGS46を37℃で1時間切断して組み立てられた。プラスミドYEP13(これはスタンフォード大学のR. Davis氏から入手したものであるが)からの2μDNAの1.56キロベース断片が、HpaⅠとHindⅢを用いて

YEP13を切断してとり出された。この得られた断片はゲル精製され、フェノール抽出され、さらにエタノール沈殿され、次にHindⅢ限定切断が行われた切目に鈍い端末を作り出すためにT4DNAポリメラーゼ(上を見よ)を用いて処理された。フェノール抽出とエタノール沈殿後のPvuⅡ切断DNAと鈍い端末を有する2μDNA断片とはゲル電気泳動によつて精製され、次に終夜お互に結聚された。かくて得られたプラスミドpCGS40は成長させることができ、大腸菌中またはサッカロミセスセレビジエ(cerevisiae)中におけるその存在は選別されることができる。形質転換と制限分析のあと、牛の成長ホルモン''Zを含有する要望されたプラスミドpCGS75が得られた。

このプラスミドpCGS75はSalⅠを用いて切断され、次に大腸菌DNAポリメラーゼⅠによる処理によつて鈍い端末を有するものにされた。この鈍い端末を有するDNAはそれからXbaⅠを用いて切断され、その断片はゲル精製された。この同一プラスミドはまたEcoRI/XbaⅠを用いて

切断されて断片を生じた。そしてその断片は、前に単離されたSalⅠ-鈍い端末の/XbaⅠ断片やpBM125のEcoRI/BamHI断片との結聚で直ちに酵母の連続往復式ベクトル上に、P_{GOAL1}牛成長ホルモン''Zを含有するpCGS118を生じた。P_{GOAL1}プロモーター(820bp)はpBM125(スタンフォード大学のR. Davis氏の好意)から作つた。pBM125はBamHIで切断され、次に大腸菌DNAポリメラーゼⅠを充填され、次にEcoRIを用いて切断された。

P_{GOAL1}によつて機能を促進される牛の成長ホルモン遺伝子を含有するpCGS144の組み立ては三分子反応によつて成遂げられた。GAL1プロモーターと牛の成長ホルモン遺伝子の一部とはpCGS118からXbaⅠおよびPstⅠによる限定切断によりとり出された。牛の成長ホルモンの残りはPstⅠおよびCfaⅠを用いてのpCGE27の切断によつて得た。これらのゲル精製された断片は2μの一部分とURA3遺伝子とを含有するpCGS57のXbaⅠ/CfaⅠ断片と結聚された。

酵母株 CGY150 (MAT_a, *leu2-3, leu2-112, ura3-50*) は、A. Hinnen, J. B. Hicks および G. Fink の方法 [Hinnen, A., Hicks, J. B. および Fink, G. F., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933 (1978)] によつて牛の成長ホルモンプラズミド DNA を用いて形質転換された。酵母の形質転換された菌 CGY196 が採取されたが、これはプラズミド上に *URA3* 遺伝子が存在するためウラシルを添加しなくても成長が可能である。(プラズミド pCGS144 を保持する株 CGY196 は米国類型培養コレクション (ATCC) に預けられている。受け入れ番号 20643。1982年9月預け入れ。)

この酵母の細胞を、6.7 g/ℓ 酵母培養ベース、30 mg/ℓ の L-ロイシンおよび2%のガラクトースを含有する培地中で攪拌下30℃で成長させた。牛の成長ホルモンの合成はガラクトースの存在によつてひきおこされた。攪拌下30℃でクレット (Klett) = 50 まで成長後、その細胞は遠心分離で集められ、0.05 M のトリス-HCl, pH

7.6, 20% グリセリンおよび1 mM の PMSF から成る0.25 ml 中に再分散され、次に-20℃で凍結された。R. Rose らの方法 [Rose, M., Casadaban, M. J. および Botstein, D., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 2460-2464 (1981)] によつてガラスのビードでその細胞は分裂させられた。細胞の抽出物中の牛の成長ホルモンの活性度の量は免疫沈殿により測定された。製造された牛の成長ホルモン遺伝子を順序どおりに並べる情報は図6に示す。

例 2.

インターフェロンの製造

1. 1FN mRNA の単離

3.55 g のせんだいウイルスに誘導されたりんば球がドゥンスホモグナイザーで、50 mM の醋酸ソーダ, pH 5.2; 6 M のグアニジン HCl; および0.1 M の2-メルカプトエタノールから成る冷緩衝液(10℃)の中で分裂させられた。得られた溶液は60 W のパルスされた電力で2×30秒の間超音波処理され、次にそれは、0.1 M の

EDTA を含む5.8 M の CsCl, pH 7.2 の3 ml の薄層の上に流した。その混合液を、ベックマンタイプ50 Ti ローターの中で40,000 rpm で一晩中15℃で遠心分離した。このペレットは上の冷緩衝液に20 mM の EDTA をプラスしたものの6.6 ml 中で水冷したが20分間再分散された。次にそれは水冷100%エタノールの3.3 ml で処理された。それを-20℃に冷却して1時間置いたのち、その沈殿物は、-10℃で20分間8000 rpm で遠心分離して小粒状にされた。このペレットは1.8 ml の前の緩衝液中に2回再分散された。その分散液は水冷100%エタノールの9 ml で処理され、次に-20℃に1時間冷却され、次にそのペレットは上述したようにして集められた。その最終のペレットは60℃に加熱された8 ml の0.1 M の EDTA の中に再分散され、次に0.1 容の2 M 醋酸ソーダ, pH 5.0 と2倍容の水冷100%エタノールとが加えられ、次にその溶液は-20℃で一晩おかれた。RNA 沈殿物が、-10℃で8000 rpm の遠心分離を20分間行うことによつ

て集められた。それは5 ml の水に溶かされた。収量は396 mg の RNA であつた。この RNA 水溶液は2×濃厚結合緩衝液(20 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 2 mM の EDTA; 0.4% の SDS; および0.24 M の NaCl) の5 ml で希釈された。この RNA は1 ml のオリゴ-dT-セルローズカラムに通して吸着させた。次にカラムは1×濃厚結合緩衝液で洗滌したのち、ポリA-含有 RNA (mRNA) は、NaCl を含有しない結合緩衝液でカラムを洗滌して溶離された。約39 mg のポリA-含有 RNA が得られた。ポリA-含有 RNA の一部が、ガラス管中で鬼の網赤球溶解物系 [Pelham, H. R. B. および Jackson, R. J., *欧州生物化学雑誌* **67**, 247-256 (1976)] の中で翻訳されてインターフェロンを指定する mRNA の単離が確認された。

2. 二重に抄られたコピー DNA (cDNA) の製造

25 μg のりんば球ポリA-含有 RNA から、それを50 mM のトリス-HCl, pH 8.3; 100 mM の KCl; 8 mM の MgCl₂; 0.4 mM の

デチオスレイトール；各1.2 mMのdATP，
dGTPおよびdTTP；および100単位の逆転
写酵素および0.25 mMの α - 32 P-dGTP(1.8
Ci/μモル)を含有する20 μg/mlのオリゴ
(-dT)₁₂₋₁₈とから成る液中で42℃で1時間
培養することによつて、約2.5 μgのcDNAを合
成した。この反応混合物を100℃で3.5分間加
熱し、次に氷上で約3分間それを急冷し、次に沈
殿したたん白質を遠心分離して除いた後、上澄み
液にHepes-NaOH, pH 6.9を100 mMまで；
MgCl₂を5 mMまで；デチオスレイトールを0.5
mMまで；およびデオキシヌクレオシドの三磷酸
エステルを上述のとおりそれぞれ加えた。この混
合物を300単位の大腸菌DNAポリメラーゼI
と共に15℃で2.5時間培養した結果1.8 μgの
二重に捻られたcDNAを生成した。このDNAは
フェノール抽出され、次にそのDNAは、とりこ
まれている三磷酸エステルから、Sephadex G
-100上のクロマトグラフィー(13 mlカラム，
0.68 cm × 3.7 cm，20 mMのトリス-HCl，

pH 7.5と3.5 mMのEDTAとで溶離)によつて
分離された。次にそれは、1/10容の2 Mの醋酸ソ
ーダ，pH 5，と2.5倍容の冷エタノールとを添
加して-20℃に冷却して一晩放置してエタノ
ール沈殿を行つた。この二重に捻られたcDNAは次
に、緩衝液(0.3 MのNaCl，30 mMの醋酸ソ
ーダ，pH 4.6，および3 mMのZnSO₄)中で
8000単位のS₁ヌクレアーゼを用いて37℃で
処理された。この反応は、EDTAを10 mMまで
およびトリス-HCl，pH 8.3を200 mMまで
添加して停止させられた。次にこの混合物は平衡
されたビオゲルA-150 mカラム(0.7 cm ×
3.5 cm)に通して吸着させ、次にそれは10 mM
のトリス-HCl，pH 7.5，250 mMのNaCl
および1 mM EDTAからなる液を用いて溶離した。
高分子量のDNAの複数のフラクション(各0.5
ml)はプールされ、それは次に1/10容の2 Mの醋
酸ソーダ；pH 5，および2.5倍容の冷100多
のエタノールを加えてエタノール沈殿を行つた。

3. HindIIIリンカーの添加

S₁処理された二重に捻られたcDNA(0.21 μg)
は、緩衝液(60 mMのトリス-HCl，pH 7.5；
8 mMのMgCl₂；5 mMのデチオスレイトール；
1 mMのATPおよび1 mMの各デオキシヌクレ
オシド)の中で9単位の大腸菌DNAポリメラー
ゼIとともに10℃で10分間培養され、次にそ
れは氷上で冷却された。この鈍い端末を有する二
重に捻られたcDNAは次に、65 mMのトリス-
HCl，pH 7.5；MgCl₂；5 mMのデチオスレ
イトール；および1 mMのATPから成る液中で
160 pモルの 32 P-置換識別された合成リンカ
ー(cDNA端より100×過剰)および4鈍い端
末単位のT4DNAリガーゼと共に15℃で5分間
培養され、次に氷上で冷却され、次に熱処理して
リガーゼを不活性化し、次に5.6 mMのトリス-
HCl，pH 7.5，および5.6 mMのMgCl₂より成
る液中でHindIII限定内ヌクレアーゼ(ニューイ
ングランドバイオラボ、9単位)を使用して37℃
で4時間45分間処理し、次にそれをフェノール
抽出した。この抽出液はビオゲルA-150 mカ

ラム(0.7 cm × 3.15 cm)上で分別された。高分
子量のDNAを含有する複数のフラクション(各
0.5 ml)はプールされてエタノール沈殿された。

HindIII 縦集末端を有するこの二重に捻られた
cDNAは、HindIII 限定内ヌクレアーゼを用いて
切り開かれていた流動性ファージCGF4の二重に
捻られたDNAに結着され、次にそれはH. Goodman
およびR. J. MacDonaldの方法[Goodman, H. M.
およびMacDonald, R. J., 酵素学の方法, 68,
75-91(1979)]によつて小牛の腸のアルカリ
性磷酸酵素を用いて処理されて末端の磷酸エステ
ルが除かれた。(註：ファージCGF4を作るため
に、流動性ファージR229[Bocke, J. D.,
Mol. Gen. Genet. 181, 288-291(1981)]が
EcoRIを用いて切断され、次にT4DNAポリメ
ラーゼを用いて鈍い端末を有するものにされ、次
にコロプラチで研究会社(マサチューセッツ州レ
キシントン)からのHindIII合成オリゴヌクレオ
チドリリンカーと結着された。)その結着反応には
60 mMのトリス-HCl，pH 7.5；6 mMの

MgCl₂; 7 mM のデチオスレイトール; 0.12 μg の二重に熱られた cDNA; 1.2 μg の CGF4 DNA; 0.5 mM の ATP および 450 縦集端単位の T4 DNA リガーゼが含まれた。結集反応は 15℃ で 19 時間であつた。

4. 組換え CGF4 DNA による大腸菌 DB4548 のトランスフェクション

大腸菌株 CGE6 (DB4548; hsdR⁻, hsdM⁺, supE, supF, B₂⁻, met⁻) が 150 ml のトリプトン肉汁の中で振動しながら 37℃ で生長させられ、OD₇₀₀ = 0.5 で 4℃ 10 分間の 7000 rpm 遠心分離によつて収獲された。その細胞は 70 ml の氷冷 50 mM の CaCl₂ 中に再分散され、0℃ で 30 分間静置された。この懸濁液はそれから 4℃ で 7000 rpm で 10 分間遠心分離され、次に 3 ml の氷冷 50 mM の CaCl₂ 中に再び分散された。0℃ で 2 時間放置後、その細胞はトランスフェクションに用いられた。

50 mM のトリス-HCl, pH 7.5 中の結集反応液の 1:40 希釈液の 1 μl か 2 μl が、50

μl の無菌 50 mM のトリス-HCl, pH 7.5 を入れてある 12 本のチューブのおのおのに加えられた。あの CaCl₂ 処理した細胞懸濁液の 1/10 ml を上のおのおののチューブに加え、その混合物は 30 分間氷上で冷却された。その混合物を 37℃ に 2 分間加温したのち、終夜培養された CGE5 (JM101:J. Messing (1979), Δ(lac prs) SupE thi⁻ バックグラウンド中の F' trad 36 proAB lacIZ⁺ M15) の 0.2 ml と 0.7 分の柔い寒天培地の 3 ml とがその混合物に加えられ、次にその混合物はトリプトン寒天培地プレートに注がれた。37℃ で一晚培養したところ 1280 以上のプラクを生じた。

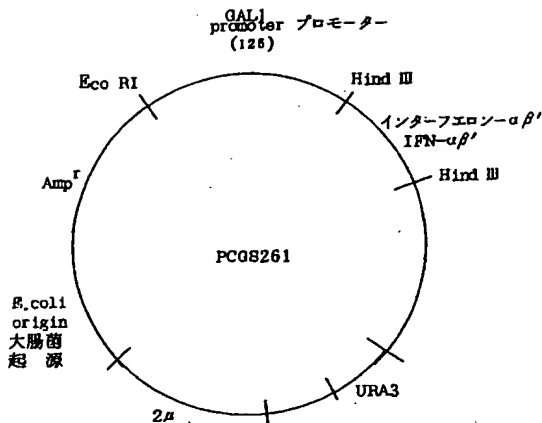
5. 白血球インターフェロン配号系列を保持する組換え CGF4 の同定

プラクはニトロセルローズに移され、Benton および Davis が述べたようにして [Benton, W. D. および Davis, R. W., 科学 196, 180-182 (1977)], LeIFN の既知のセグメントに対応する ³²P-置換識別された合成オリゴヌクレ

オチド (CATGATTTCTGCTCTGAC の配号系列を有する。コラボラチブ研究会社製。) を使用してそれは探索された。66 mM のトリス-HCl, pH 7.5 と 10 mM の MgCl₂ とを含有する 20 μl の反応液中で 6 単位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (P-L ビオケミカル) を使用してオリゴヌクレオチド (1 μg) に 0.5 mCi γ-³²P-ATP を転移させた。この合成オリゴヌクレオチドプローブに強く雑種繁殖したファージが板から採取されて 4℃ で TY 培地中で貯えられた。健全なファージのサンプルが CGE5 細胞上で一晚成長させて増強されて遠心分離で収獲され、次に 0.37 M のトリス-グリシン, pH 9.5 を含む 0.6 分のアガロースゲル中で電気泳動にかけられ、次に 0.2 N NaOH で 1 時間処理しさらに 0.5 M のトリス-HCl, pH 7.4 中で中和したのちエシジューム臭化物で着色された。移動はファージ DNA の大きさの log に逆比例するので、それにより 1000~1200 基本対の大きさをもつ挿入された IFNDNA を保持するファージの選別が可能となつた。この

ファージから、Moses の方法 [Moses, P. B., Boeke, J. D., 堀内, K. および Zinder, N. D., Virology 104, 267-273 (1980)] により二重に熱られた RFIDNA が作られた。この DNA が HindIII 限定内ヌクレアーゼを用いて切断され、得られた断片をアガロースゲル上で分析して挿入物は HindIII の部位にあつて予想された大きさであつたことを確認した。ファージ DNA の中の 1 つで約 1200 基本対 (bp) の挿入物を有するものが選別されて更に検討された。この DNA 挿入物は Maxam および Gilbert の方法 [Maxam, A. M. および Gilbert, W., 酵素学の方法 68, 499-560 (1980)] によつて順序どおりに並べられた。

表 7



6. サツカロミセスセレビジエ中の Le インターフェロンの表示

表 7 に見られるとおり酵母中の Le インターフェロンの表示をつかむのを容易にするよう考案されたプラスミド pCGS261 が組立てられた。酵母

び 66 mM のデチオスレイトールを含む液中で 4 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (Klenow 断片) と 0.1 mM の各ヌクレオシド三リン酸エステルとを用いてその DNA を室温で 30 分間処理することによってその複製端はふさがれた。

66 mM のトリス HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl₂; 10 mM の 2-メルカプトエタノール; 500 p モルの ³²P-オリゴヌクレオチド (5 μg) と共に 1 mM の ATP; 4 p モルの DNA (20 μg) および 4 鈍い端末単位の T4 DNA リガーゼを含む液中で、上記の合成オリゴヌクレオチドが Sau 3A 断片に 17℃ で一晩中結集された。この結集反応は ATG 開始コードンを新しく作り、最初のコードン TGT を復活した。10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl₂; および 1 mg/ml の牛の血清アルブミンを含む 20 μl の反応液中で 20 単位の限定内ヌクレアーゼ Cla I を用いてこの断片を 37℃ で 3 時間処理することによって Cla I ポリリンカーは除かれた。この得られた断片はプラスミド pBH322 の Cla I 部位

中に Le インターフェロンを生成するため、ATG 開始コードンが成熟した加工されたインターフェロン (IFN) の最初のコードン (システイン用の TGT) の 5'-側面にとり込まれた。Sau 3A はこの最初のコードンの 3'-側面で切断するという事実にもとづいて、コラボラチブ研究会社によって、Cla I によって認識されかつ ATG-TGT 系列を含有するオリゴヌクレオチド (ACACATCGATG TGT) が合成された。アミノ酸残基の 2 から 61 までをコード化する Sau 3A 断片は、10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl₂; および 60 mM の NaCl を含む 50 μl の反応液の中で 10 単位の Sau 3A 限定内ヌクレアーゼを使用して Hind III 1.2 キロベース断片の 30 μg を 37℃ で 4 時間消化することによって、精製された。その DNA 断片はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製された。この DNA はフェノール抽出され、次に氷冷 100% エタノールで沈殿させられた。66 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 66 mM の NaCl; 66 mM の MgCl₂ およ

びクローンされた。このプラスミド (10 μg) は、10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl₂ および 1 mg/ml の牛の血清アルブミンを含む 20 μl の反応液中で限定内ヌクレアーゼ Cla I (ニューイングランドビオラボ、20 単位) を用いて 37℃ で 2 時間切断された。限定切断されたプラスミドのこの製剤はフェノール抽出され、次にエタノール沈殿させられ、次にそれは H. Goodman および R.J. MacDonald の方法 (Goodman, H.M. および MacDonald, R.J., 酵素学の方法 68, 75-91 (1979)) によって牛の腸の磷酸酵素を用いて処理されて末端の磷酸エステルがとり除かれた。上述の Cla I 処理断片の約 0.5 p モルとこの Cla I 切断プラスミドの約 0.3 p モルとが 66 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 66 mM の MgCl₂; 10 mM のデチオスレイトール; 1 mM の ATP; およびプラスミド pCGE32 を新しく作る T4 DNA リガーゼ (ニューイングランドビオラボ、300 単位) を含有する 20 μl の反応液中で 15℃ で 3 時間お互に結集された。

形質転換の能力のある大腸菌株 CGE43 (LG90; $F^{\Delta}(\text{lac-pro})_x$) が CGE6 に対して前に述べたとおりにして調製された。あの結集された DNA の 5 μg がこの細胞の 200 μg と 0℃ で 30 分間混合され、次に 37℃ で 2 分間熱処理され、次に 18℃ で 10 分間培養され、次に新鮮なトリプトン肉汁で 5 倍に希釈された。振動しながら 37℃ で 30 分間培養後、この細胞はアンピシリン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含有するトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが採取されてプラスミド DNA が調製され、次にそれは限定酵素消化により分析された。この判定基準により数個の細胞は要望されたプラスミド pCGE32 を保持した。

インターフェロン遺伝子の残りは、アミノ酸残基 37 を指定する領域に位置する EcoRI 部位を使用して元に戻された。プラスミド pCGE32 DNA (10 μg) は、10 mM のトリス-HCl, pH 7.5; 10 mM の MgCl_2 ; 60 mM の NaCl ; および 1 mg/ml の牛の血清アルブミンを含む 20

μg の反応液中で限定内ヌクレアーゼ HindIII (コラボラチブ研究会社, 12 単位) を用いて 37℃ で 2 時間切断された。この DNA は次に、100 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 10 mM の MgCl_2 ; 30 mM の NaCl ; および 1 mg/ml の牛の血清アルブミンを含む 20 μg の反応液中で内ヌクレアーゼ EcoRI (コラボラチブ研究会社, 15 単位) を用いて 37℃ で 3 時間消化された。この限定切断 DNA はフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解してから予備の水平の 1.5% アガロースゲルに加えられた。40 mM のトリス-アセテート, pH 7.2 中で 2-3 時間電気泳動後、そのゲルはエジューム臭化物を用いて着色し、次にそれは長波長の紫外光線の下で試験された。アミノ酸残基 37 に ATG-TGT のコードを指定する消化された HindIII から EcoRI までのバンドは切り取られ、そしてこの DNA はゲルピースを凍結して次に解かすこと

[Thuring ら、分析生物化学 66, 213 (1975)] によつて抽出された。この DNA 断片はエタノール

に沈殿され、次に水に再溶解された。インターフェロンクロンを含有するこのプラスミド (20 μg) は上と同様に限定内ヌクレアーゼ HindIII (ニューイングランドビオラボ、180 単位) を用いて 37℃ で 2 時間切断され、次にこの DNA (12 μg) は限定ヌクレアーゼ EcoRI (ニューイングランドビオラボ、24 単位) を用いて 37℃ で 6 分間切断された。この限定切断 DNA はフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解された。この EcoRI から HindIII までの断片はインターフェロンの 3'-翻訳しない領域にアミノ酸残基 37 を指定するものであるが、その断片はゲル電気泳動により分析されてゲルから切り取られた (上を見よ)。

各断片の約 0.25 p モルがともに、6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mM の MgCl_2 ; 10 mM のデチオスレイトール; 1 mM の ATP および T4 DNA リガーゼ (ニューイングランドビオラボ、300 単位) を含有する 20 μg の反応液中で、HindIII 部位 (上を見よ) で開かれたプ

ラスミド pBR322 に結集された。

形質転換の能力のある大腸菌株 CGE43 細胞が正確に上述したとおりにして調製された。そしてこの結集された DNA の 5 μg がこの細胞の 100 μg と 0℃ で 30 分間混合され、次に 37℃ で 2.5 分間熱処理され、次に新鮮なトリプトン肉汁で 10 倍に希釈された。振動しながら 37℃ で 30 分間培養後、細胞はアンピシリン (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含むトリプトン板上にうすく延ばされた。アンピシリンに抵抗性のあるコロニーが採取されてプラスミド DNA が調製され、それは限定酵素消化によつて分析された。この判定基準により数個の株は要望されたプラスミド pCGE38 を保持した。

P_{GAL1} が EcoRI および BamHI 部位の間に挿入された標準の連続往復式ベクトルである pCGS 109 の中に HindIII 部位が組立てられた。ベクトル pCGS109 は BamHI 限定酵素を用いて切断され、S ϕ ヌクレアーゼを用いて消化されて薬液端を除いて鈍い端末を有するものにし、次に HindIII

リンカーに結繋された。このベクトルは Hind III 限定酵素を用いて処理され、次に凝集端が互に結繋されてベクトル pCGS135 を生成した。プラスミド pCGE38 を限定内ヌクレアーゼ Hind III を用いて上と同様に 37℃ で 1.5 時間切断することによつて、そのプラスミド (30 μ g) から Le インターフェロンの遺伝子を含有する 1.1 キロベース Hind III 断片が単離された。この制限切断 DNA はフェノール抽出され、次にエタノール沈殿され、次に水に再溶解されて予備の 1% アガロースゲルに加えられた。40 mM のトリス-アセテート中で電気泳動後、このゲルはエジニウム臭化物で着色されて長波長紫外線の下で試験された。1.1 キロベースバンドが切り取られ、この DNA は、ゲルを凍結して次に解かす方法 [Thurning ら、分析生物化学 66, 213 (1975)] により抽出された。この DNA 断片はエタノール沈殿され、次に水に再溶解された。この Hind III 断片の約 0.2 μ g が、P_{QAL} 領域に隣接した Hind III 部位で開かれたプラスミド pCGS135 (1 μ g)

に結繋された。このベクトルとインターフェロン断片との結繋は、6.6 mM のトリス-HCl, pH 7.6; 6.6 mM の $MgCl_2$; 10 mM のデチオスレイトール; 1 mM の ATP および T4 DNA リガーゼ (コラボラチブ研究会社, 10 単位) を含む 20 μ l の反応液中で 14℃ で行われた。

このプラスミド DNA を使用して A. Hinnen, J. B. Hicks および G. Fink の方法 [Hinnen, A., Hicks, J. B. および Fink G. F., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978)] により、酵母菌 CGY528 (*ura3-52, his4-29, pep4-3, GAL+*) が形質転換された。プラスミド上に URA3 が存在するためウラシルが添加されなくても成長が可能な酵母の形質転換品の CGY528 が採取された。(プラスミド pCGS261 を保持する株 CGY528 は米國類型培養コレクション (ATCC) に預けてある。受入れ番号 20663, 1983 年 2 月預け入れ。)

この酵母細胞は、6.7 g/l の酵母窒素ベースと 20 μ g/l のヒスチジンと 2% のガラクトース

とを含有する培地中で振動しながら 30℃ で成長させた。インターフェロンの合成はクレフト = 50 (10^7 細胞/ml) まで成長させたこの細胞を遠心分離して集めることによつて確認された。すなわち集めた細胞は 0.05 M のトリス-HCl, pH 7.6; 20% のグリセリンおよび 1 mM の PMSF を含む 0.25 ml の液中に再分散させ、次に -20℃ で凍結した。この細胞は、M. Rose らの方法 [Rose, M., Casadaban, M. J. および Botstein, D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 2460-2464 (1981)] によりガラスビードで分裂させられた。細胞の抽出物中のインターフェロン活性度の量は常法により定量され可溶たん白質 1 μ g 当たり 10^5 単位であつた。

生成された人間の白血球のインターフェロン遺伝子を順序とおりに並べる情報を表 8 に示す。

-40	-30	-20	-10	0	10	20	30
T	T	T	T	T	T	T	T
CAAGCTT GTC ATTCACTTAA AGGATCTGAG CAGCTGAC AGGCTGCTGAC	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	ATG GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
40	50	60	70	80	90	100	110
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
120	130	140	150	160	170	180	190
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
200	210	220	230	240	250	260	270
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
280	290	300	310	320	330	340	350
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
360	370	380	390	400	410	420	430
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
440	450	460	470	480	490	500	510
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
520	530	540	550	560	570	580	590
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
600	610	620	630	640	650	660	670
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
680	690	700	710	720	730	740	750
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
760	770	780	790	800	810	820	830
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
840	850	860	870	880	890	900	910
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
920	930	940	950	960	970	980	990
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220	1230
CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT	CTC ACC TAC AAG TCA TTT AAG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT

実施例3

プロレンニンの製造

1. RNAの単離

乳汁-飼養の子牛からの異組織を他方の畜殺場から新しく入手した。即ち第4胃の粘液を胃壁から切開して取出し、ドライアイス中で冷凍した。21gの粘液質組織を混合機によつてpH 7.5のトリス塩酸塩50ミリモル、グアニジン塩酸塩8Mおよびジチオスレイトール1ミリモルとからなる緩衝液(10℃)200mlの中に崩解させた。不溶性物質をソルバル(sorvall)SA-600回転子の中に10,000rpmで12分間遠心分離により除去した。スピンドルからの上澄液200mlに氷冷無水エタノール100mlを添加した。-20℃で1.5時間後、沈殿を-10℃で30分間3000rpmで遠心分離によりペレット化した。ペレットをGUTA 20ミリモル、pH 7のNaOAc 20ミリモル、pH 7のグアニジン塩酸塩8モル及びジチオスレイトール1ミリモルよりなる氷冷緩衝液(EGAD)に溶解した。冷無水エタノール2.0ml

を添加し、溶液を-20℃に45分間放置した。沈殿は-10℃で20分間3000rpmで遠心分離によりペレット化した。ペレットは40mlの冷EGAD緩衝液中に再溶解し、冷エタノール20mlによる沈殿、遠心分離及びEGAD緩衝液中に於けるペレットの再溶解を更に2回反復した。最後にペレットをpH 7、20ミリモルのEDTA 16mlに溶解しクロロホルム：イソブタノール(4:1)により3回抽出した。次に、2容量の4.5モルpH 5.2のNaOAcを水層に添加し、溶液は-20℃で一晩放置した。RNAの沈殿は-10℃で10,000rpmで25分間遠心分離により収集し、水30ml中に溶解した。収量はRNA 45mgであつた。RNAはpH 5の2モルのNaOAc 1ml及び無水エタノール75mlの添加により沈殿させ、続いて-20℃で一晩培養した。RNAは遠心分離(10,000rpm、-10℃10分)によりペレット化し、水20mlに再溶解し、60℃に10分間加熱し、氷上で迅速に冷却し2倍の酸度の緩衝液(pH 7.5のトリス塩酸塩20ミリモル、

pH 7 の 2 ミリモルの EDTA、0.4 % SDS 及び NaCl (0.24 モル) で希釈した。RNA を 4 ml のオリゴ-dT-セルロースカラムに添加し、カラムを 1 倍濃度の結合緩衝液 4.5 ml で洗脱し、次いで塩を含みぬ結合緩衝液でカラムを洗脱することによりポリ A-含有 RNA を溶離した。約 1 mg のポリ A-含有 RNA が得られた。ポリ A 含有 RNA の 1 部を試験管内でうさぎの網状赤血球溶解質系に翻訳した (エッチ・アール・ビー・ペルハム (H.R.B. Pelham) 及びアール・ジェ・ジャクソン (R.J. Jackson) (1976) (Eur. J. Biochem. 67, 247-256))。タンパク質生成物は 10 % ポリアクリルアミドゲル上で分析した。主要の単一タンパク質バンドが観察され、これはレンニン mRNA がポリ A-含有 RNA 中に存在することを示すレンニン抗血清により沈降した。

2. 二重鎖複写 DNA (cDNA) の製造

cDNA 約 8.7 μ g を子牛の胃ポリ A-含有 RNA 2.0 μ g から逆トランスクリプターゼ 100 単位及び 1 Ci/ミリモルの 32 P-dGTP を含有する

pH 8.3 のトリス・塩酸塩 50 ミリモル、 $MgCl_2$ 8 ミリモル、ジチオスレイトール 0.4 ミリモル、各デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 1 ミリモル、オリゴ(-dT)₁₂₋₁₈ 2.0 μ g/ml 中で 42°C で 1 時間培養することにより合成した。反応混合物を 100°C で 30 分間加熱した後氷上で 3 分間冷却し、遠心分離により沈殿したタンパク質を除去し、上澄液物質の半量に pH 6.9 のヘプス KOH 100 ミリモル迄、 $MgCl_2$ 5 ミリモル迄、ジチオスレイトール 0.5 ミリモル迄、デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 0.12 ミリモルを添加した。この混合物を 300 単位の大腸菌 DNA ポリメラーゼ I により 16°C で 2 時間培養し二重鎖 cDNA 8.6 μ g を生産した。DNA はフェノール抽出しセフアデックス G-100 上でクロマトグラフィーにより混合しない 3 リン酸塩から分離した (12 ml カラム、0.7 cm \times 30 cm、pH 7.5 のトリス・塩酸塩を 20 ミリモル、EDTA 0.5 ミリモルにより溶離した)、かつ pH 5 の 2 モルの NaOAc $1/10$ 容量及び冷エタノール 2.5 容量を添加し -20°C で一夜

エタノール沈殿を行つた。2 重鎖 cDNA (4.6 μ g) を次に 37°C で 1 時間緩衝液 S ($NaCl$ 0.3 モル、pH 4.6 の NaOAc 30 ミリモル、 $ZnSO_4$ 3 ミリモル) 中で 1000 単位の S ϕ スクレアーゼで処理した。反応は EDTA 10 ミリモル迄、pH 8.3 のトリス・塩酸塩 200 ミリモル迄を添加して終結させ、混合物をピオゲル A-150 m カラム (0.7 cm \times 33 cm) に加え pH 7.5 のトリス・塩酸塩 10 ミリモル、EDTA 1 ミリモル及び NaCl 250 ミリモルにより平衡かつ溶離した。高分子量 DNA のピークの留分 (各 0.5 ml) はプールし、かつ pH 5 の NaOAc 2 モル $1/10$ 容量及び冷無水エタノール 2.5 容量を添加しエタノール沈殿させた。

3. Hind III 制限剤の付加

S ϕ 処理した二重鎖 cDNA (1.7 μ g) を緩衝液 T (pH 8、のトリス・塩酸塩 25 ミリモル、 $MgCl_2$ 6.6 ミリモル、EDTA 0.5 ミリモル、2-メルカプトエタノール 5 ミリモル及び各デオキシヌクレオシド 3 リン酸塩 0.5 ミリモル) 中で

T₄ DNA ポリメラーゼ 2 単位により室温で 30 分間培養した。この物質をフェノール抽出し、pH 5、2 モルの NaOAc $1/10$ 容量及びエタノール 2.5 容量を添加しエタノール沈殿した。プラント終了 2 重鎖 cDNA は次に pH 7.6 のトリス・塩酸塩 6.6 ミリモル、 $MgCl_2$ 6.6 ミリモル、2-メルカプトエタノール 5 ミリモル、ATP 0.5 ミリモル中で 300 p モルの 32 P-標識 Hind III 合成制限剤 (cDNA 末端に 100 倍過剰) 及びプラント終了 9 単位の T₄ DNA リガーゼにより 12°C で一夜培養した。

反応は EDTA 10 ミリモル pH 8 に調節し、ピオゲル A-150 m カラム (0.7 cm \times 20 cm) 上で分留した。高分子量 DNA 含有留分をプールし、エタノール沈殿した。この物質は pH 7.6 のトリス・塩酸塩 5.6 ミリモル、 $MgCl_2$ 5.6 ミリモル中で Hind III 制限エンドヌクレアーゼ (9 単位) により 37°C で 45 分間処理し、次いでエタノール抽出し、pH 5 の 1 モルの NaOAc $1/10$ 容量及び無水ツルコール 2.5 容量を添加しエタノール

沈殿した。HindIII 緩集末端を有する二重鎖 cDNA は次に HindIII 制限エンドヌクレアーゼにより切り開かれた *f*φ ファージ CGF₄ 二重鎖 DNA に結集され、エツチ・グッドマン (H. Goodman) 及びアル・ジェ・マクドナルド (R. J. McDonald) の方法 (H. M. Goodman and R. J. MacDonald, *Methods in Enzymology*, 68, 75-91 (1979) により牛の腸のホスファターゼにより 2 回処理し末端リン酸塩を除去した (註: ファージ CGF₄ を製造するため、*f*φ ファージ R229 [ジェ・ディ・ベツケ (J. D. Boeckes), *Mol. Gen. Genet.* 181, 288-291 (1981)] は EcoRI エンドヌクレアーゼにより切断し T₄ DNA ポリメラーゼによりプラント終了マサチューセッツ州ウオルサムのコラボラティブ・リサーチ社からの HindIII 合成オリゴヌクレオチド結集剤により結集した)。結集反応液は pH 7.6 のトリス・塩酸塩 6.6 ミリモル、MgCl₂ 6.6 ミリモル、メルカプトエタノール 5 ミリモル、二重鎖 cDNA 0.3 μg、CGF₄ DNA 0.2 μg、ATP 0.5 ミリモル及び緩集末端 300

単位の T₄ DNA リガーゼを包含した。結集は 16℃ で 29 時間であつた。

4. 組換え - CGF₄ DNA による大腸菌 BNN45 のトランスフェクション

大腸菌系統の CGE6 (BNN45; hsdR⁻, hsdM⁺, supE, supF, BL⁻, met⁻) はトリプトンブロス中で 37℃ で振盪しつつ増殖させ、4℃ で 7000 rpm で 10 分間遠心分離により OD₇₀₀ = 0.5 で回収した。細胞は氷冷 CaCl₂ 50 ミリモル中 (元の培養容量の 2 分の 1) で再懸濁し、0℃ で 30 分間に静置させた。懸濁液は次に 4℃ で 10 分間 7000 rpm で遠心分離し元の培養容量の 1/20 の氷冷 CaCl₂ 50 ミリモル中に再懸濁させた。0℃ で 60 分間放置した後、細胞をトランスフェクションの為に使用した。2.0 μl 結集反応物の 2 分の 1 ミクロリットルを pH 7.6 の 50 ミリモルの無菌トリス・塩酸塩 50 μl を包含する 8 本の各々の試験管に添加した。CaCl₂ 処理細胞の 10 分の 1 ミリリットルを各管に添加し、混合物を氷上に 30 分間静置した。37℃ に 2 分間加温

した後、0.2 ml の CGE5 (J. M101; ジェ・メツシング (J. Messing (1979), Ftra D36 pro AB lac IZΔM15 in a Δ(lac pro) SupE t^{hi} background) を一夜培養し、0.7 分の柔かな寒天 3 ml を加え混合物を 8 本のトリプトン寒天プレート上に注加した。37℃ 一夜培養してプレート当たり約 250 斑点が生成した。

5. レンニンコード付け配列を保有する組換え CGF₄ の同定

ブラックをニトロセルロースに移植しベントン及びダビス (W. D. Ben-Ton and R. W. Davis (1977) *science*, 196, 180-182) により記載された如く α³²P-dGTP 及び逆トランスクリプターゼ (T. P. St. John and R. W. Davis (1979) *Cell*, 16, 443-452) を使用する子牛の胃ポリ A 含有 RNA から製造した ³²P 標識 cDNA を使用し試験した。標識 cDNA に強くハイブリッド形成した約 80 の組換えファージをプレートから取り T₄ 媒体中に 4℃ で貯蔵した。完全なファージの試料を CGE5 細胞上で一夜増殖し

て増幅し、遠心分離により回収し、pH 9.5 のトリス・グリレン 0.37 モルを含有する 2 分の 1 アガロースゲル中で電気泳動にかけ、0.2 規定の NaOH 中に 1 時間処理し、かつ pH 7.4 のトリス・塩酸塩 0.5 モル中で中和した後、臭化エチジウムで染色した。遊走はファージ DNA の大きさの対数に逆比例し、大きさ 1000-2000 ベースの対の挿入 DNA を伴う 8 ファージの選択ができた。2 重鎖 RFIDNA はこれらの 8 ファージからモーセス等の方法 (P. B. Moses, J. D. Boeckes, Horiuchi, N. D. Zinder (1980) *Virology*, 104, 267) により製造した。この DNA は HindIII で切断し、得られたフラグメントはアガロースゲル上で分析し挿入が HindIII 部位にあり、予期した大きさであることを確認した。最後に、4 個の組換えファージからの DNA (各々から約 5-10 μg) 及び媒介 CGF₄ からの DNA を HindIII で切断し、フラグメントは 45 分間沸騰し、ドライアイス/エタノール中で冷凍することにより変性した後、20 倍の SSC で予備処理し

乾燥したニトロセルロースの薄片上に水中のDNAを点滴することによりニトロセルロースに結合させた。真空中で7.5℃に1.5時間焼成した後ニトロセルロースに結合したDNAはミラー等により記載されたハイブリッド選択法により(J.S. Miller, R.P. Ricciardi, B.E. Roberts, B. M. Paterson, N.B. Mathews(1980) J. Mol. Biol. 142, 455-488) 各々のハイブリッド形成にポリA-の豊富な子牛の胃のRNA 2μg を使用して実施した。溶離したRNAは次にペルハム及びジャクソンの方法により(H.R. Pelham R.J. Jackson(1976) Eur. J. Biochem. 67 247-256)³⁵S-メチオニンで標識した網状赤血球溶解質系に翻訳し、得られたタンパク質生成物はレムリイ(U. Laemmli(1970) Nature 227 680-685) 0.1% SDSを含有する10%のポリアクリルアミドゲル上で分析した。ゲル分析の結果は試験したファージDNAの4個全ては選択した4種全体がうさぎの網状赤血球溶解質に翻訳中に大きさ及び免疫学的規準においてプレ

ープロレニンに同一なタンパク質製品を生ずるRNA系を選択したのでレニンmRNAにハイブリッド形成したことを示した。4種の中2種、約1400ペア(bp)の挿入を有する293-207及び約1250bpの挿入を有する293-118/37が将来の研究のため選択された。DNA挿入はマキサム及びギルバートの方法により配列された(S.M. Maxam and W. Gilbert(1980) Methods in Enzymology, 68, 499-560)。ヌクレオチド205から1350まではプレープロレニンA遺伝子に対するDNA配列である(第9表参照)ヌクレオチドの配列1-204及び1351-1460はプレープロレニンに付着されるがもし望まなければ除去でき式中の遺伝子の利用には重要でない。第9表のDNA物質の有用な部分は分離し、かつ既知の技術で利用できる。

第 9 表

50	AGA	CTT	GGG	CGA	CGG	AGG	GGT	AGG	GGT	CGA	TTC	CGA	CGA	TTC	CGT	CGA	ATT	CGG	CAT	AGG	TGA
100	AGA	CTT	GGG	CGA	CGG	AGG	GGT	AGG	GGT	CGA	TTC	CGA	CGA	TTC	CGT	CGA	ATT	CGG	CAT	AGG	TGA
150	AGA	CTT	GGG	CGA	CGG	AGG	GGT	AGG	GGT	CGA	TTC	CGA	CGA	TTC	CGT	CGA	ATT	CGG	CAT	AGG	TGA
200	AGA	CTT	GGG	CGA	CGG	AGG	GGT	AGG	GGT	CGA	TTC	CGA	CGA	TTC	CGT	CGA	ATT	CGG	CAT	AGG	TGA
250	AGA	CTT	GGG	CGA	CGG	AGG	GGT	AGG	GGT	CGA	TTC	CGA	CGA	TTC	CGT	CGA	ATT	CGG	CAT	AGG	TGA
300	CTC	TTC	CAG	GGC	GCT	GAG	ATC	ACC	ATG	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC	ATC
350	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
400	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
450	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
500	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
550	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
600	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
650	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
700	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
750	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
800	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
850	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
900	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
950	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1000	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1050	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1100	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1150	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1200	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1250	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1300	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1350	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1400	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1450	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1500	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1550	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1600	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1650	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1700	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1750	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1800	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1850	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1900	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
1950	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2000	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2050	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2100	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2150	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2200	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2250	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2300	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2350	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2400	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2450	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2500	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2550	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2600	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2650	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2700	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2750	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2800	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2850	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2900	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
2950	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3000	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3050	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3100	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3150	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3200	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3250	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3300	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3350	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3400	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3450	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3500	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3550	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3600	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3650	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3700	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3750	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3800	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
3850	GGT	GGT																			

この表には293-207両者からの情報が組合わされている。即ち組換えファージ293-207は削除されるヌクレオチド848-961を除いて第9表に示された配列を帯びる挿入部をヌクレオチド1番から少なくともヌクレオチド1360番まで保有しているが、ファージ293-118/37はヌクレオチド229番からヌクレオチド1460番迄の配列を帯びる挿入部を保有する。配列した結果により示された如く、レンニン合成の開始はメチオニンコード(ヌクレオチド205-207)に起り精製プロレンニンに比較し更に付加した16のアミノ酸を持つプレープロレンニンを生ずる。(プロプロレンニンBアミノ酸配列はビー・フォルトマン等(B. Foltman *et al*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 2321-2324 (1977) 及びビー・フォルトマン等(B. Foltman *et al* *J. Biol. Chem.* 254, 8447-8456 (1979))により発表された。即ち、第9表のヌクレオチド配列データはプレープロレンニンの存在の最初の表示である。2種の組換え ϕ ファージ293 -

207及び293-118/37は共に全プレープロレンニンA分子に対しDNAの配列を保有する。プレープロレンニンAのプロレンニン部分はアミノ酸290番に於けるプロレンニンBとは異なる(フォルトマン等(上記参照))により記載された如くレンニンA中のアスパラギン酸塩及びレンニンB中のグリシン、即ちアミノ酸の位置番号はフォルトマンのそれである)。アスパラギンコードンはアミノ酸位置204番に示されたが、フォルトマンはその位置にアスパラギン酸塩を報告した。然しながら、これはアスパラギン酸塩及びグルタミン酸塩のアミドはそれらの酸形態と区別することは困難であるからアミノ酸配列の誤りであるが、ヌクレオチドの配列は容易にそのコードンを容易に区別できる。

ファージ293-118/37により代表されるクローンのレンニン遺伝子はウシゲノムの複写またはレンニン遺伝子の複写の性質を調査するのに使用された。これらの実験は種々の制限酵素はより切断し、アガロースゲルにより分離し、サウザー

ンの方法(E.M. Southern (1975) *J. Mol. Biol.* 98 503-517)により翻訳したウシDNAに対し刻み目-翻訳の方法(P.W.J. Rigby, M. Dieckman, C. Rhodes and P. Berg [1977] *J. Mol. Biol.* 113, 327-251)により ^{32}P により標識したクローンのレンニンDNAをハイブリッド形成することにより実施した。その結果はクローンのプロレンニンcDNA配列を切断しないSac I及びBgl Iの如き酵素によるウシDNAの制限エンドヌクレアーゼの開裂はそれにも拘わらずレンニン配列にハイブリッド形成するDNAの1以上のバンドを屢々生ずることを示した。これは(a)レンニン情報のゲノムの複写が更にDNAを包含し、恐らくレンニンcDNAには見出されない制限酵素位置を含有する配列が介在するか、(b)1個以上のレンニン遺伝子が複写間で切断したゲノム及び制限酵素中に存在することを示唆している。後者の可能性はクローンのレンニンcDNAの5'及び3'末端から誘導された ^{32}P 標識した検体と制限切断ウシゲノムのDNAをハイブ

リッド形成することにより除去された。例えば制限エンドヌクレアーゼEcoRI及びBamHを使用したこれらの結果はレンニンコード付け情報の単一のゲノム複写と一致した。これはビ、フォルトマン等により観察されたレンニンのA及びB形態(*J. Biol. Chem.* 254, 8447-8456 (1979))がレンニン遺伝子の2種の異なる対立遺伝子の製品に最も類似することを意味する。更にレンニン遺伝子のウシゲノムの複写は介在する配列を含有し、その観点でゲノムの複写はプレープロレンニンに対する伝令RNAに一致する我々のクローンのcDNAと異なる。

6. 酵母におけるプロレンニンの表現法

組換え ϕ ファージCGF293-207 RF I DNA (40 μg)をHindIII (N. E. 生物研, 15単位)及びBglII (N. E. 生物研, 14単位)により前記の如く103 μg の反応容量で37℃で1時間切断した。制限カットDNAを予備の水平のアガロースゲルに添加しbp 293-207の435のピースを切り取りアガロース切片を冷凍し粉砕

することにより溶離した。エタノール沈殿をさせた後、DNAは水に再溶解し、約1 μ gをHhaI (N.E. 生物研, 0.06単位)により37℃で15分間部分的に切断してPR発端培養を含有する190 bp HhaI~BglII 切片を得た。このDNAフラグメントを前記の如くゲルにより単離し、pH 7.5のTris-HCl 60ミリモル、MgCl₂ 8ミリモル、ジチオスレイトール10ミリモル及び各デオキシヌクレオチド3リン酸塩0.2ミリモルを含有する反応液30 μ l中でDNAポリメラーゼI (Boehringer Mannheim, 14単位)により室温で30分間処理することによりプラント終了させた。DNAはフェノール抽出し、エタノール沈殿した。

ATGG (例えばCGATCTAGATGG)で終るXbaI制限エンドヌクレアーゼ配列を保持する合成オリゴヌクレオチドはコラボラチブ・リサーチ社によるトリエステル法 (K. Itakura 等, J. Biol. Chem. 250 4592 [1975])により合成し、5 μ gを6単位のT₄ポリヌクレオチド キナーゼ

XbaIの位置で開口したCGF12-f ϕ 株体を含有する結紮反応液中で培養し、次いで前記のようにアルカリ性ホスファターゼで処理した。結紮反応のアリコートを上記の如くLG90系の形質変換適格細胞に使用した。形質変換細胞をf ϕ 感能細胞 (JM101)を含有するトリプトン-酵母抽出プレート上に置いた。多数のフーヅブラスクを採取し、各々の培養株を少量のFR1-DNAを与えるまで増殖した。制限エンドヌクレアーゼ消化 (XbaI及びHaeIII)及びアガロースゲル電気泳動は若干のフーヅクローンは望ましい190 bpフラグメントを望ましい配位 (CGF12の1個のEcoRI位置に隣接するプロレンニン遺伝子の5'-末端)に保有した。かゝる1個の単離体をCGF21と称した。

約10 μ gのCGF21 DNAを前記の反応液40 μ l中でPstI (N.E. 生物研, 10単位)により37℃で45分間切断した。100 bp PstI/EcoRI フラグメントをアクリルアミドゲルにより単離した。プラスミドpBR322 (8 μ g

(P-L Biochemicals)を使用しpH 7.6のTris HCl, MgCl₂ 10ミリモル、2メルカプトエタノール10ミリモル及び20モルのATPを含有する反応液35 μ l中でX³²P-ATPによりキナーゼ化した。この5'-標識オリゴヌクレオチド (22 P-モル末端)を約0.5 pモルの190 bpフラグメントに緩衝液プラス500単位のT₄ DNAリガーゼ (N.E. 生物研)と共に添加した。反応液は15℃で1時間次に4℃で一夜培養し、次いでNaCl 180ミリモル、MgCl₂ 7ミリモル及びpH 8のTris 5ミリモルの4容量で希釈した。65℃で5分間加熱した後、12単位のXbaI制限エンドヌクレアーゼ (1.5時間の全消化に対し1時間後に更に5単位を添加した)で処理した。最後にオリゴヌクレオチド単量体を結鎖した190 bp DNAからゲル電気泳動 (7%ポリアクリルアミド・ゲル)により除去した。DNAフラグメントはアクリルアミド切片から緩衝液中に24時間浸漬することにより溶離した。DNAはエタノール沈殿させ、水15 μ lに再溶解し、

まで)を反応容量30 μ l中でEcoRI (N.E. 生物研, 7.5単位)及びHindIII (N.E. 生物研; 7.5単位)により37℃で1時間切断した。得られたHindIII/EcoRI フラグメント (4.3 Kb) はアガロースゲルで精製した。CGF293-118/37 DNA (10 μ g) は反応容量30 μ l中でPstI (N.E. 生物研, 8単位)及びHindIII (N.E. 生物研, 10単位)により37℃で1時間切断した。1.1 kb PstI/HindIII DNAフラグメントはアガロースゲルにより精製した。3個のDNAフラグメントを3-分子結合反応液に加えpCG68を生じた。3分子結紮 (反応容量27 μ l) は等モル比の3フラグメント合計1.5 μ g DNAを含有した。結紮反応を400単位のT₄ DNAリガーゼ (N.E. 生物研)により12℃で8時間実施した。結紮反応のアリコートは記載したようにLG392系の形質変換適格細胞に使用した。制限酵素消化 (PstI, XbaI, BglII及びKpnI)及びアガロースゲルによるプラスミドDNAの分析は若干の単離体が望ましいプラス

ミド pCGE68 を保有した。このプラスミドは DNA コード付けする Met-プロレンニンを含有する。

pCGE68 DNA (10 μ g) は XbaI (N.E. 生物研, 10 単位) により 37℃ で 2 時間切断した。エタノールによる沈殿後、S₁ スクレアーゼ (30 単位) で 37℃ で 30 分間の処理によりブランクを終了させた。フェノール抽出及びエタノール予備沈殿の後、DNA を 5'-加リン酸反応した SaI 結鎖剤 (コラボラチブ・リサーチ社, 2.5 μ g) により培養した。結鎖剤は pH 7.6 Tris-HCl 10 ミリモル、MgCl₂ 10 ミリモル、2-メルカプトエタノール 10 ミリモル及び ATP 0.12 mM を含有する反応液 10 μ l 中で 2.5 単位の T₄ ポリヌクレオチドキナーゼ (P-L バイオケミカル) を使用し、 γ -³²P-ATP によりキナーゼ化している。結鎖剤は反応液 2.5 μ l 中 プラント終了 pCGE68 DNA に 14℃ で 8 時間結鎖した。得られた結鎖された DNA 含有 SaI 結鎖剤は BNN45 株の形質転換適格細胞に使用した。制

限酵素 (SaI) 及びアガロースゲルは所望のプラスミド、pCGE91 を確認するのに使用した。

酵母におけるプロレンニンの組立を新しく開始した。問題の第 1 酵母媒介体、pCGS128 は 3 切片の結鎖から作成した。最初に pCGE91 を SaI (N.E. 生物研, 10 単位) により 37℃ で 3 時間切断した。この DNA フラグメントは次に pH 7.5 Tris-HCl 10 ミリモル、MgCl₂ 8 ミリモル、ジチオスレイトール 10 ミリモル及び 0.2 ミリモルの各デオキシヌクレオチドを含有する反応液 50 μ l 中で DNA ポリメラーゼ I (ペーリンガー/マンハイム, 10 単位) により室温で 1 時間の処理でプラントを終了した。プラント終了 DNA は次にエタノール沈殿し再溶解し HindIII (N.E. 生物研, 7.5 単位) で 37℃ で 1 時間切断した。1200 bp プラント終了 SaI/HindIII DNA フラグメントをアガロースゲル電気泳動により精製した。シャトル媒介体の必要な成分を含有する次の DNA フラグメントは cCGS40 から精製した。この後者の媒介体は EcoRI

及び HindIII により切断され、得られた 7000 bp フラグメントはアガロースゲル電気泳動により精製した。BamHI により切断された pBM125 (スタンホード大学アル・デービス (R. Davis) の好意) から得られた P_{GOAL} プロモーターを含有する第 3 DNA フラグメントは DNA ポリメラーゼ I プラス全 4 デオキシヌクレオチド 3 リン酸塩でプラントし、次いで EcoRI で切断し、P_{GOAL} 125 と名付けられた 820 bp 切片を生じた。プロモーターの長さを画くヌクレオチド配列は第 1 表に示した。DNA の 3 切片 (pCGE91, プラント終了 SaI/HindIII からの 1200 bp, pCGS40 EcoRI/HindIII からの 7000 bp 及び P_{GOAL} 125 からの 820 bp) を T₄ DNA リガーゼ (コラボラチブ・リサーチ社、プラント終了 2 単位) 及び適当な緩衝液及び ATP を含有する反応液 25 μ l 中で等モル量のフラグメントを使用して互に結鎖し、14℃ で 18 時間培養した。

結鎖した DNA は菌株 CGE129 の適格細胞を転換するのに使用した。制限酵素消化及びアガ

ロースゲルによるプラスミド DNA の分析は所望のプラスミド CGY150 を保有する単離体を示した。pCGS128 の DNA は酵母菌株 CGY150 を転換するのに使用した。変換したスフェロプラスタを選択した。酵母菌株はプロレンニン (~0.02%) を保有することを示した。

プロレンニンの表現を増加するため更に組立を実施した。pCGS128 DNA を HindIII により切断した。Suc2 遺伝子の 3' 末端からのフラグメントは HindIII により切断し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I によりプラント終了を作成し次いで SaI 結鎖剤が結鎖された。得られたフラグメントは SaI 及び BamHI 及び SaI で切断された pCGS40 中に結鎖されたゲル精製 1 kb DNA フラグメントを生成した。

得られたベクトル、pCGS108 を HpaI 及び SaI で切断し大腸菌 DNA ポリメラーゼ I でプラントを作成しゲル精製した。HindIII 結鎖剤 (コラボラチブ・リサーチ、長さ 10 ヌクレオチド) が次に HindIII で切断された DNA フラグ

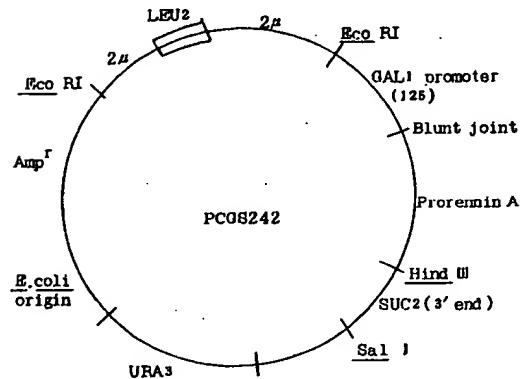
メントに結紮され、ゲル精製されて pCGS128 の HindIII 位置に結紮されて pCGS108を生産する 650 bp フラグメントを生産した。

1 部の EcoRI 及び SalI 切片は pCGS168 媒介体よりなり、P_{OAL}125 及びプロレンニンを含有する 2.6 kb DNA フラグメントを単離した。1 部の EcoRI 切片は 2 μ DNA フラグメント上に LEU2 遺伝子を含有するゲル精製した 2.3 kb フラグメントを生成する PJDB219 から製造された。これらの 2 個の DNA フラグメントは共に EcoRI/SalI 消化により YEp5 (URA₃ が pCGS241 及び pCGS242 を生成する選択を包含する) に結紮された。(第 10 表) 構造における差異は 2.3 kb フラグメントの 2 つの配位に依る。両ベクトルは別々に形質変換 GY150 に使用された。制限酵素消化及びアガロースゲルによるプラスミド DNA の分析は西部分析によるプロレンニン表現の水準をもつ所望のプラスミドが 0.2 多の可溶性タンパク質に増加したことを示した。そのタンパク質はレンニンに変換後、乳汁凝

塊活性を示した。

プラスミド pCGS242 を保有する菌株 GY461 はアメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に寄託中であり、1983 年 2 月に寄託した。受入番号 20662。

第 10 表



実施例 4

この実験には実施例 3 の工程 1-5 を反復した。

6. 酵母中のプレプロレンニンの表現

組換え体 f₈ フォージ GGF293/207FRIDNA (20μg) は反応液 100 μg 中で AvaII (N.E. 生物研, 5 単位) により切断した。256 bp AvaII フラグメントはゲル電気泳動により精製し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントによりブラン終了フラグメントを作った。フェノール抽出及びエタノール沈殿の後、DNA は HindIII 結鎖剤 (コラボラチブ・リサーチ, GAAGCTTG) により結紮し、次に HindIII (N.E. 生物研, 15 単位) 及び BglII (N.E. 生物研, 3.6 単位) により切断した。245 bp フラグメントはプレプロレンニン遺伝子の一部を包含するゲル電気泳動により精製した。プラスミド pCGS28 DNA (ピー・アルフォード (B. Alford) 等により 1981 年 12 月 1 日出願した米国特許出願番号第 325,481 号) は BglII (N.E. 生物研, 5 単位) 及び SalI (N.E. 生物研, 10 単位) に

より切断し残部のプレプロレンニン遺伝子を含有する 1000 bp DNA フラグメントはゲルにより精製した。これら 2 個の DNA フラグメントは互に HindIII (N.E. 生物研, 12 単位) 及び SalI (N.E. 生物研, 8 単位) により切断した PBR322 により結紮した。この媒介体は形質変換適格性大腸菌細胞に使用され、多数の大腸菌クローンからのプラスミド DNA の得られた制限酵素分析は大腸菌菌種 CGE130 中に所望のプラスミド pCGE63 を示した。

プレプロレンニン遺伝子は P_{OAL}126 であるプレプロレンニンである pCGE3 DNA を組立てるのに使用した。プラスミド pCGE63 DNA により HindIII 及び SalI により切断しプレプロレンニン DNA を含有する 1200 bp フラグメントを得た。EcoRI/HindIII の 2 重消化は P_{auc}2 を含有する 850 bp フラグメントを得るため pRB118 に実施した。これらのフラグメントは記載した 3 分子反応液中でシャトル媒介体の特性を取り入れる pCGS40 の EcoRI/SalI フラグメン

トにより結繋した。この混合物は形質変換適格性の CGE129 大腸菌細胞に使用した。所望のプラスミド pCGS64 を保有する大腸菌のクローンは多数の被変換体からのプラスミド DNA の制限消化により同定した。

pCGS64 の Bgl II / Sma I フラグメント (~9 kb) はゲル電気泳動により精製しプレプロレンニン遺伝子並びに pCGS EcoRI / Sma I フラグメントの一部を含有した。大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプレプロレンニン遺伝子の水蒸気中で Sma I 位置で融合したプレプロレンニンの残分を含有する pCGE74 の Bgl II / Xho-13600bp フラグメントは pCGS64 から一片に結繋した。形質変換を実施し、制限分析は所望の酵母プラスミド pCGS81 の存在を示した。

Psuc2 は最初に Hind III による制限により、続いて大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントにより充填することにより pCGS81 から除去した。開口したプラスミドは次に EcoRI により制限し、大フラグメント マイナス Psuc

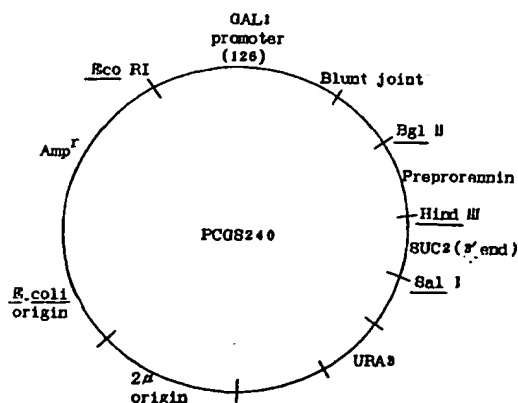
2 をゲル精製した。P_{GAL}126 は pBM126 (フール・デービス, スタンフォード大学の好意) の制限により取得した。プラスミド pBM126 は BamHI により切断し、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow フラグメントで充填し、ついで EcoRI により切断し所望の 750 bp P_{GAL}126 を得た。これら 2 個のフラグメントは互に結繋して P_{GAL}126 プレプロレンニン'Z (茲に'Z は 1 部の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を喪失する) を含有する pCGS148 を得た。

DNA の 1000bp の 1 片は pCGS148 を EcoRI 及び Bgl II による消化により得た。更に pCGS168 の Bgl II / Sma I 1800bp はゲル精製した。これら 2 個のフラグメントは刺刺の pCGS40 の 8 kb EcoRI / Sma I フラグメントに結繋した。適格性の大腸菌 CGE129 の形質変換を実施して制限分析は所望のプラスミド pCGS240 を所有するクローンを示した。pCGS240 を所有する大腸菌から製造したプラスミド DNA は酵母菌株 CGY150 を形質変換するのに使用し

た。酵母菌株 CGY457 はその形質変換から得られプラスミド pCGS240 を保有する。レンニン抗体による面取のハイブリッド形成により実証されたように GAL1 促進剤からのタンパクの表現の水準は可溶性タンパク質 0.2 迄であつた。

プラスミド pCGS240 を帯びた菌株 CGY457 はアメリカン タイプ カルチャーコレクション (ATCC) に寄託中で、1983 年 2 月に寄託し受付番号は 20661 である。

第 2 表



本発明の特定の態様が明示され、かつ記載されているが、多くの変化が可能である。例えば本発明は主としてウシ生長ホルモン、インターフェロン、プロレンニン及び酵母中のプレプロレンニンの如きポリペプチドの製造における GAL1 促進剤の使用に関するものである。明らかに、他のタンパク質製品は規定された操作関係において本発明の GAL1 促進剤を使用して取得し、かつ表現できる。かゝるポリペプチドは酵素または他の生物学的に活性タンパク質である。前記実施例はかゝる機構の操作の実例である。

代理人 弁理士 (8107) 佐々木清隆
(ほか 3 名)



第1頁の続き

⑤Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 1/16
C 12 R 1:865)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:865)

⑦発明者	ジェラルド・ラルフ・フイック	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02167、ブルックリン、アストン・ロード 40
⑧発明者	アリソン・タウントン・リグビー	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01773、リンコルン、ファアレア・ロード (番地なし)
⑨発明者	ロバート・ジェントリ・ノウルトン	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02173、レキシントン、シヤーレイ・ストリート 30
⑩発明者	ジェン・イ・マオ	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01730、ベッドフォード、ゴールド・ロード 35
⑪発明者	ドナルド・テイラー・モア	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01730、ウォルサム、ヴァージニア・ロード 39
⑫発明者	クリストファー・ゴツドフリー・ゴフ	アメリカ合衆国 ペンシルヴァニア 19041、ハヴァーフオード、ナンバー・ツ・カレッジ・アヴェニュー 773

手続補正書

昭和59年5月31日

特許庁長官殿

(特許庁事務官)



1. 事件の表示

昭和59年特許願第 35472 号

2. 発明の名称

GAL 1 酵母菌プロモーターの使用

3. 補正をする者

事件との関係：特許出願人

名称 コラボラティブ・リサーチ・インコーポレイテッド

4. 代理人

〒100
住所 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル29階
霞が関ビル内郵便局。私書箱第49号

栄光特許事務所 電話(581)-9601(代表)

氏名 弁護士(8107) 佐々木 清隆 (ほか 3名)



5. 補正命令の日付 (自発)

昭和 年 月 日 (発出日：昭和 年 月 日)

6. 補正により増加する発明の数 0

7. 補正の対象

1) 特許出願人の代表者を記載した適正な願書

2) タイプ印書による明細書の添書 3) 代理権を証明する書面

8. 補正の内容

1), 2), 3) 共に別紙の通り(ただし、2)は内容に変更なし)



_G1 yeast promoter linked to non galactokinase gene

Patent Number: ☐ US4661454

Publication date: 1987-04-28

Inventor(s): KNOWLTON ROBERT G (US); FINK GERALD R (US); MAO JEN-I (US); MOIR DONALD T (US); BOTSTEIN DAVID (US); DAVIS RONALD W (US); GOFF CHRISTOPHER G (US); TAUNTON-RIGBY ALISON (US)

Applicant(s): COLLABORATIVE RES INC (US)

Requested Patent: ☐ JP60058077

Application Number: US19830470911 19830228

Priority Number (s): US19830470911 19830228

IPC Classification: C12N1/18; C12N15/00; C12N1/00; C07H15/12

EC Classification: C07K14/56, C07K14/61, C12N9/64F2C23M1, C12N15/66, C12N15/81

Equivalents: CA1273883, CA1283373, DE3484689D, ☐ DK97784, ☐ EP0123811, A3, B1, ☐ GB2137208

Abstract

A DNA segment containing a GAL1 promoter linked to a gene other than the galactokinase gene for directing the expression of the gene within a yeast cell.